

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 443 582**

51 Int. Cl.:

A61K 39/00 (2006.01)

G01N 33/50 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.06.2004 E 11154325 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.01.2014 EP 2343083**

54 Título: **Método para diagnosticar el cáncer que comprende la medición de las células precursoras de CTL específicos de WT1**

30 Prioridad:

27.06.2003 JP 2003184436

12.03.2004 JP 2004070497

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

19.02.2014

73 Titular/es:

**INTERNATIONAL INSTITUTE OF CANCER
IMMUNOLOGY, INC. (100.0%)
13-9, Enoki-cho, Suita-shi
Osaka-fu, Osaka, JP**

72 Inventor/es:

SUGIYAMA, HARUO

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

ES 2 443 582 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Método para diagnosticar el cáncer que comprende la medición de las células precursoras de CTL específicos de WT1

5

Campo técnico

[0001] La invención se refiere a un método in vitro para diagnosticar el cáncer basándose en la frecuencia de las células precursoras de CTL específicos de WT1. La descripción se refiere generalmente a un método de selección de pacientes altamente sensibles a la vacuna de WT1 y un método terapéutico para el seguimiento del cáncer que implica dicho método de selección. Más concretamente, se describe en la presente memoria un método de selección de pacientes altamente sensibles a la vacuna de WT1 basándose en la frecuencia de precursores de CTL específicos de WT1 como indicador, y similares.

15 **Técnica anterior**

El gen WT1 (gen de tumor de Wilms 1) se ha identificado como uno de los genes causantes del tumor de Wilms que es un tumor renal de la infancia (Cell 60: 509, 1990, Nature 343: 774, 1990). El gen WT1 codifica el factor de transcripción WT1 y WT1 desempeña un papel importante en muchos procesos tales como la proliferación, la diferenciación y la apoptosis de células y el desarrollo de tejidos (Int. Rev. Cytol. 181: 151, 1998). El gen WT1 se definió originalmente como un gen supresor de tumores. Sin embargo, estudios posteriores revelaron que el gen WT1 está altamente expresado en la leucemia y diversos cánceres sólidos incluyendo el cáncer de pulmón y el cáncer de mama y por lo tanto, se indica que el gen WT1 ejerce una función oncogénica que promueve el crecimiento canceroso. Además, se demostró que la estimulación in vitro de células mononucleares de sangre periférica, siendo dichas células positivas para HLA-A*0201 o HLA-A*2402, con péptidos derivados de WT1 induce los linfocitos T citotóxicos específicos de péptido (CTL) y los CTL destruyen las células de leucemia o de tumor sólido que expresan de forma endógena WT1. Estos resultados demostraron que WT1 es una molécula diana prometedor para inmunoterapia de cáncer (Int. J. Hematol 76: 127, 2002).

Ha habido métodos conocidos para determinar CTL específicos de péptido antigénico in vitro, incluyendo el método del monómero de HLA, el método del dímero de HLA y el método del tetrámero de HLA (Science 274: 94, 1996), el método del pentámero de HLA y el método ELISPOT (J. Immunol. Methods 110:29, 1988), la técnica de RT-PCR en tiempo real (J. Immunol. Methods 210:195, 1997), el método de dilución limitante (Br. J. Cancer 77: 1907, 1998) y similares. El tetrámero de HLA se prepara por biotilación de un complejo (monómero de HLA) formado por asociación de la cadena α de HLA y la β 2microglobulina con un péptido, y permitiendo que el monómero se una a avidina marcada con fluorescencia para la tetramerización. Las frecuencias de los CTL se pueden medir tiñendo CTL específicos de péptido con tetrámeros de HLA y analizando por medio de citometría de flujo. La medición de las frecuencias de CTL por el método del monómero de HLA, el método del dímero de HLA y el método del pentámero de HLA se pueden llevar a cabo basándose en el mismo principio.

Los CTL no estimulados con vacuna se denominan "células precursoras de CTL". Se considera que cuanto mayor sea la frecuencia de la existencia de células precursoras de CTL específicas para un antígeno canceroso dado, más eficazmente pueden inducirse CTL específicos, cuando dicho antígeno se administra como una vacuna para el cáncer, que hace más fácil conseguir respuesta clínica de la terapia con la vacuna contra el cáncer. En otras palabras, si se selecciona un paciente que muestra alta frecuencia de existencia con respecto a las células precursoras de CTL específicas para un antígeno canceroso dado antes de la vacunación, sería posible tratarlo más eficazmente mediante el uso de dicho antígeno canceroso.

La frecuencia de células precursoras de CTL se midió utilizando el tetrámero de HLA y células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de pacientes con melanoma y se ha presentado en varios artículos; sin embargo, estos muestran que la frecuencia de células precursoras de CTL específicas para un péptido antigénico tumoral es baja (J. Immunother. 24: 66, 2001, Hum. Gene. Ther. 13: 569, 2002). A partir de estos resultados, se ha considerado que la frecuencia de existencia de las células precursoras de CTL específicas para un antígeno es generalmente baja y que es difícil seleccionar pacientes adecuados para una vacuna contra el cáncer basándose en la frecuencia de células precursoras de CTL como indicador.

El documento WO 03037060 extrae de la técnica anterior que el gen WT1 es un buen marcador para el diagnóstico de la progresión de la enfermedad de cáncer y sugiere el uso de complejos tetrámeros que comprenden péptidos derivados de WT1 para la detección de células T específicas de WT1 y su uso en la detección temprana de los tumores malignos asociados con WT1 y para el control de la enfermedad residual mínima.

Maeda et al, 2002 (Brit J Cancer, 87, 796-804) describe un método para el tratamiento con una vacuna contra tumores que implica la detección de células precursoras de CTL específicas de péptidos en el estado de prevacunación. Los autores muestran que son detectables células precursoras de CTL específicas de péptido en la

mayoría de los pacientes con cáncer, pero el porcentaje de estas células no implica automáticamente que la persona sometida a ensayo padezca cáncer.

Descripción de la invención

5 En su sentido más amplio la presente invención se refiere a métodos como los definidos en las reivindicaciones. En la presente memoria se describe un método de selección de un paciente muy sensible a la vacuna de WT1 sobre la base de la frecuencia de las células precursoras de CTL específicos de WT1 como indicador, y similares.

10 **[0009]** Se preparó un tetrámero de HLA utilizando un péptido antigénico tumoral derivado de WT1, y se utilizó el tetrámero resultante en la medición de la frecuencia de las células precursoras de CTL en pacientes de tumores malignos hematopoyéticos o cáncer de pulmón antes de la administración de la vacuna. Se encontró que células precursoras de CTL (células precursoras de CTL específicos de WT1) existen con una frecuencia más alta que la que se conocía hasta ahora en comparación con individuos sanos. Este resultado reveló que es posible seleccionar
15 pacientes altamente sensibles a la vacuna de WT1 o identificar una molécula diana de la vacuna de WT1 sobre la base de la frecuencia de las células precursoras de CTL específicos de WT1 como indicador, en la medida en la que se refiera antígeno tumoral WT1. También, ya que los pacientes que tienen diversos tipos de cáncer mostraron una alta frecuencia de células precursoras de CTL específicos de WT1, se hizo evidente que el diagnóstico del cáncer puede realizarse sobre la base de la frecuencia de las células precursoras de CTL específicos de WT1 como
20 indicador.

[0010] A continuación las células precursoras de CTL específicos de WT1 se clasificaron detalladamente con respecto a su función, y se encontró que, en particular, la célula precursora de CTL de tipo efector de (en adelante, puede ser referida simplemente como "célula efectora") existe en mayor proporción entre las células precursoras de
25 CTL. Este resultado indicó que la selección de pacientes altamente sensibles a la vacuna de WT1 o el diagnóstico de cáncer también se puede llevar a cabo sobre la base de la frecuencia de las células precursoras de CTL específicos de WT1 de tipo efector como indicador.

[0011] Además, se midió la frecuencia de CTL específicos de WT1 en pacientes sometidos a tratamiento con un péptido antigénico tumoral ("péptido WT1") derivado de WT1 y se encontró que el efecto terapéutico se correlacionaba con el aumento de la frecuencia de CTL después de la administración con respecto a la obtenida
30 antes de la administración.

[0012] La presente invención se ha establecido sobre la base de las conclusiones anteriores.

35 Por lo tanto, la presente invención proporciona lo siguiente:

- (1) Un método in vitro de diagnóstico del cáncer, que comprende las siguientes etapas (a) y (b) :
- 40 (a) medir la frecuencia de existencia o la cantidad de células precursoras de CTL específicos de WT1 en una muestra biológica que contiene células precursoras de CTL de un sujeto de ensayo (a) ; y
(b) decidir si el valor medido de (a) es o no elevado en comparación con el de un sujeto sano, y evaluar el sujeto de ensayo como un paciente que tiene cáncer cuando el valor medido de (a) es 1,5 veces o mayor el de un sujeto sano,

45 en donde la medición de la frecuencia de existencia o la cantidad de células precursoras de CTL específicos de WT1 se lleva a cabo por medio de uno cualquiera del método del monómero de HLA, el método del dímero de HLA, el método del tetrámero de HLA y el método del pentámero de HLA.

(2) El método de diagnóstico del cáncer de acuerdo con el apartado (1), en donde la medición se lleva a cabo de acuerdo con el método del tetrámero de HLA.

50 (3) El método de diagnóstico de cáncer de acuerdo con el apartado (1), en donde la etapa (b) de la reivindicación (1) se lleva a cabo mediante la medición de la proporción de células unidas al tetrámero de HLA entre los CTL positivas para CD8 o positivos para CD8/CD3.

(4) El método de diagnóstico del cáncer de acuerdo con el apartado (3), en donde el antígeno HLA como componente del tetrámero de HLA es un antígeno HLA-A24 o un antígeno HLA-A2.

55 (5) El método de diagnóstico del cáncer de acuerdo con uno cualquiera de los apartados (1) a (4), que se lleva a cabo utilizando citometría de flujo.

(6) El método de diagnóstico del cáncer de acuerdo con la reivindicación (1), en donde el antígeno HLA como un componente de un monómero de HLA, un dímero de HLA, un tetrámero de HLA o un pentámero de HLA es un antígeno HLA-A24.

60 Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 es un gráfico que muestra la frecuencia de existencia de precursores de CTL específicos de WT1 en pacientes que tienen cáncer e individuos sanos. El eje vertical indica la frecuencia de precursores de CTL (células precursoras). El "cáncer de sangre" muestra los resultados obtenidos de pacientes positivos para HLA-A2402 que

tienen un tumor maligno hematopoyético. El término "cáncer de pulmón" muestra los resultados obtenidos de pacientes positivos para HLA-A2402 que tienen cáncer de pulmón y el término "sano" los resultados obtenidos de individuos sanos positivos para HLA-A2402.

5 Mejor modo para llevar a cabo la invención

La presente invención proporciona un método in vitro para diagnosticar el cáncer, que comprende las siguientes etapas (a) y (b),

- 10 (a) medir la frecuencia de existencia o la cantidad de células precursoras de CTL específicos de WT1 en una muestra biológica que contiene células precursoras de CTL de un sujeto de ensayo (a); y
 (b) decidir si el valor medido de (a) es o no elevado en comparación con el del sujeto sano, y evaluar el sujeto de ensayo como paciente que tiene cáncer cuando el valor medido de (a) es 1,5 veces o mayor el de un sujeto sano,

15 en donde la medición de la frecuencia de la existencia o la cantidad de células precursoras de CTL específicos de WT1 específico se lleva a cabo mediante uno cualquiera del método del monómero HLA, el método del dímero de HLA, el método tetrámero de HLA y el método del pentámero HLA.

20 La descripción también describe un método de selección de un paciente muy sensible a la vacuna de WT1, que comprende las siguientes etapas (a) y (b):

- (a) medir la frecuencia de la existencia o la cantidad de células precursoras de CTL específicos de WT1 en la muestra biológica que contiene las células precursoras de CTL a partir de un sujeto de ensayo; y
 25 (b) decidir si el valor medido de (a) es o no alto en comparación con el de un sujeto sanos, y evaluar la sensibilidad a la vacuna de WT1, y un método para tratar el cáncer en el paciente seleccionado mediante dicho método.

30 Se ha encontrado que existen células precursoras de CTL (células precursoras de CTL específicos de WT1) en un paciente antes de la administración de la vacuna con una frecuencia mayor que la conocida hasta ahora. En consecuencia, pueden seleccionarse pacientes altamente sensibles a la vacuna de WT1 basándose en la cantidad o frecuencia de células precursoras de CTL específicos de WT1 como indicador.

35 El sujeto de ensayo en la etapa (a) se refiere a una persona que se sospecha o se diagnostica que tiene cáncer, específicamente, una persona que se sospecha o se diagnostica que tiene cáncer incluyendo cánceres de la sangre tales como leucemia, síndrome mielodisplásico, mieloma múltiple y linfoma maligno, y cánceres sólidos tales como cáncer gástrico, cáncer de colon, cáncer de pulmón, cáncer de mama, cáncer embrionario, cáncer hepático, cáncer de piel, cáncer de vejiga, cáncer de próstata, cáncer uterino, cáncer cervical y cáncer de ovario. Un ejemplo preferido es una persona que se sospecha o se diagnostica que tiene leucemia, síndrome mielodisplásico y cáncer de pulmón.

40 No existen limitaciones con respecto a la muestra biológica usada en la etapa (a) siempre que contenga células precursoras de CTL. Los ejemplos específicos incluyen sangre, fluido linfático o cultivos de los mismos, células mononucleares de sangre periférica (PBMC) aisladas de sangre o tejidos en los que se infiltran linfocitos T y similares. La muestra biológica se puede utilizar tal cual o después de dilución o concentración. Un ejemplo preferido son las PBMC, que pueden aislarse de una manera convencional tal como método de centrifugación en gradiente de densidad con Ficoll-Hypaque.

50 El método para medir la frecuencia de existencia o la cantidad de células precursoras de CTL específicos de WT1 en la etapa (a) se puede llevar a cabo mediante uno cualquiera del método del monómero de HLA, el método del dímero de HLA, el método del tetrámero de HLA, el método de pentámero de HLA.

55 Según se utiliza en la presente memoria, el método de tetrámero de HLA es un método en el que se detecta un CTL específico de péptido antigénico utilizando un tetrámero de HLA preparado por biotilación de un monómero de HLA (dicho monómero se ha formado por asociación de una cadena α del antígeno HLA y una β 2-microglobulina con un péptido antigénico objetivo) y permitiendo la unión a avidina marcada con fluorescencia para la tetramerización. Específicamente, la cantidad de CTL puede determinarse tiñendo un CTL específico de péptido antigénico mediante dicho tetrámero de HLA y analizando mediante citometría de flujo. La preparación de un tetrámero de HLA y la detección de los CTL utilizando el mismo se conocen y pueden llevarse a cabo de acuerdo con un método, por ejemplo, descrito en la bibliografía (Science 274; 94, 1996).

60 El método de monómero de HLA es un método en el que se detecta un CTL específico de péptido antigénico utilizando un monómero de HLA empleado en la preparación de tetrámeros de HLA, cuyo monómero está formado

por la asociación de una cadena α de antígeno HLA y una β 2-microglobulina con un péptido antigénico seguido de biotilación.

5 El método del dímero de HLA es un método en el que se detecta un CTL específico de péptido antigénico utilizando un dímero de HLA que se prepara fusionando una cadena α de antígeno HLA y una Ig (inmunoglobulina, por ejemplo, IgG1) y permitiendo que la fusión resultante se una a β 2-microglobulina y un péptido antigénico (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6671-6675 (1993)). Los CTL específicos de péptido antigénico unidos a dímero de HLA pueden detectarse, por ejemplo, permitiendo que el anticuerpo anti-IgG1 marcado se una a IgG1.

10 El método del pentámero de HLA es un método que se ha desarrollado recientemente, en el que se detecta un CTL específico de péptido antigénico utilizando un pentámero en el que se polimerizan cinco moléculas complejas de un antígeno HLA y un péptido antigénico a través del dominio de bucles superenrollados. Puesto que el complejo de antígeno HLA-péptido antigénico se puede marcar con fluorescencia o similares, el análisis se puede llevar a cabo por medio de citometría de flujo o similar como sucede con el método de tetrámero de HLA (véase, <http://www.proimmune.co.uk/>).

El monómero, dímero, tetrámero y pentámero de HLA anteriormente mencionados están todos disponibles mediante producción a petición del cliente de un fabricante tal como Prolimmune o BD Biosciences.

20 El método ELISPOT es un método en el que se detectan los CTL en una muestra biológica inmovilizando un anticuerpo inducido contra una citocina tal como IFN- γ o GM-CSF en una placa, añadiendo una muestra biológica estimulada por un antígeno o péptido antigénico pretendido y detectando la citocina secretada a partir de los CTL activados en la muestra biológica y unida al anticuerpo inmovilizado anterior como un punto utilizando un anticuerpo anti-citocina. El método para determinar los CTL por medio del método ELISPOT es conocido y se puede llevar a cabo de acuerdo con un método descrito en la bibliografía (p. ej., J. Immunol. Methods 110: 29, 1988).

30 El método de RT-PCR en tiempo real es un método en el que la frecuencia de CTL sensible a un antígeno o péptido antigénico objetivo se mide de forma indirecta a través de la medición de un gen que codifica una citocina tal como IFN- γ , GM-CSF o similares producido por CTL activados por medio de RT-PCR. El método para determinar los CTL mediante el método de RT-PCR en tiempo real se conoce y se puede llevar a cabo de acuerdo con un método descrito en la bibliografía (p. ej., J. Immunol. Methods 210: 195, 1997).

35 El método de dilución limitante es un método en el que la frecuencia de los CTL se mide sembrando en placas una muestra biológica que contiene CTL en pocillos a diferentes densidades celulares, cultivando la placa mientras se estimula con un antígeno o péptido antigénico objetivo, midiendo la cantidad de citocinas o la citotoxicidad producida por los CTL activados y determinando la frecuencia de los CTL basándose en el número de pocillos positivos. El método para determinar los CTL por medio del método de dilución limitante es conocido y se puede llevar a cabo de acuerdo con un método descrito en la bibliografía (p. ej., Br. J. Cancer 77:1907, 1998).

40 Se acuerdo con la descripción, es posible medir la frecuencia de existencia o la cantidad de precursores de CTL específicos de WT1 de acuerdo con el método conocido para determinación de CTL como se ha mencionado anteriormente.

45 La evaluación de la sensibilidad a vacuna de WT1 en la etapa (b) se puede llevar a cabo comparando la frecuencia de existencia o la cantidad de células precursoras de CTL específicos de WT1 en un sujeto de ensayo obtenida en la etapa (a) (referido de aquí en adelante como "valor de sujeto de ensayo"), con la de un sujeto sano (referido de aquí en adelante como "valor de sujeto sano") y decidiendo la diferencia entre ellos. En este caso, se necesita un material biológico aislado y preparado a partir de un sujeto sano (sangre, fluido linfático, PBMC, etc.), que se puede obtener recogiendo una muestra biológica de un sujeto sin cáncer. Según se utiliza en la presente memoria, "sujeto sano" significa una persona a la que no se le ha diagnosticado cáncer.

50 La comparación entre los valores del sujeto de ensayo y los valores del sujeto sano se puede llevar a cabo midiendo la muestra biológica de un sujeto de ensayo y la de un sujeto sano en paralelo. Cuando no se realiza la comparación paralela, también se puede llevar a cabo la comparación utilizando un valor medio o un valor intermedio estadístico de valores del sujeto sano calculados a partir de los valores del sujeto sano obtenidos por medio de la medición de muestras biológicas plurales (al menos 2, preferiblemente 3 ó mas, más preferiblemente 5 ó más) de un sujeto sano en condiciones constantes cuando no se realiza medición paralela.

60 La evaluación de si un sujeto de ensayo es o no altamente sensible a vacuna de WT1 se puede llevar a cabo utilizando como indicador que el valor del sujeto de ensayo es 1,5 veces o más, preferiblemente 2 veces o mayor en comparación con el valor del sujeto sano. Es decir, cuando el valor del sujeto de ensayo sea 1, 5 veces o mayor, preferiblemente, 2 veces o mayor que el valor del sujeto sano, se evalúa que la sensibilidad a la vacuna de WT1 es alta. Se considera que un paciente que se ha evaluado que es altamente sensible a vacuna de WT1 es adecuado

para la vacuna de WT1, en otras palabras, es posible preferiblemente aplicar la terapia de vacuna de WT1 al paciente.

Entre los métodos anteriormente mencionados para medir los CTL, el método de tetrámero de HLA es el más preferido desde el punto de vista de facilidad y la precisión. En un aspecto adicional descrito en la presente memoria se describe un método en la presente memoria para seleccionar y tratar a un paciente altamente sensible a la vacuna de WT1 caracterizado porque usa el método del tetrámero de HLA. Como se ha mencionado anteriormente, el método del monómero de HLA, el método del dímero de HLA y el método del pentámero de HLA son principalmente los mismos que el método del tetrámero de HLA y son los métodos preferidos para medir los CTL. Sin embargo, la descripción se describirá en la presente memoria tomando el método del tetrámero de HLA como ejemplo.

El método para seleccionar y tratar un paciente altamente sensible a la vacuna de WT1 mediante el uso del tetrámero de HLA, específicamente, comprende las siguientes etapas (a), (b) y (c):

- (a) poner un tetrámero de HLA que comprende un péptido antigénico tumoral derivado de WT1 en contacto con la muestra biológica que contiene las células precursoras de CTL de un sujeto de ensayo;
- (b) medir la frecuencia de existencia o la cantidad de células precursoras de CTL específicos de WT1 unidas al tetrámero de HLA; y
- (c) decidir si el valor medido de (b) es alto o no en comparación con el del sujeto sano y evaluar la sensibilidad a la vacuna de WT1.

A este respecto, la "muestra biológica" y el "sujeto de ensayo" en la etapa (a) son los mismos que se han definido anteriormente.

El "tetrámero de HLA" utilizado en la etapa (a) se refiere a un tetrámero preparado por biotilación de un complejo (monómero de HLA) obtenido por asociación de una cadena α de antígeno HLA y una β 2-microglobulina con un péptido (péptido antigénico) y permitiendo que se una a avidina para la tetramerización (Science 279:2103-2106 (1998); y Science 274: 94-96 (1996)). El tetrámero de HLA se marca preferiblemente con fluorescencia de modo que las células precursoras de CTL puedan clasificarse o detectarse fácilmente mediante una medida de detección conocida tal como citometría de flujo, microscopía fluorescente y similares. Los ejemplos específicos incluyen tetrámeros de HLA marcados con ficoeritrina (PE), isotiocianato de fluoresceína (FITC), proteína de peridinin clorofila (PerCP), alofocianina (APC), ficoeritrina-texasred (también denominada ECD) y ficoeritrina-cianina 5.1 (también denominada PC5) o similares.

El péptido antigénico canceroso derivado de WT1 utilizado como un componente de un tetrámero de HLA anterior se origina a partir de WT1 humano (Cell, 60: 509, 1990, Núm. de acceso de la base de datos de NCBI XP_034418, SEC ID NO: 1) y es capaz de formar un complejo con un antígeno HLA y de este modo ejercer la actividad inductora de células T citotóxicas (CTL) restringidas por HLA (inmunogenicidad).

Se ha sabido que existen muchos subtipos de molécula de HLA y que la secuencia de aminoácidos del péptido antigénico tumoral con el que se une una molécula de HLA obedece a una cierta regla (motivo de unión) (Immunogenetics, 41, pág. 178, 1995; J. Immunol., 155: pág. 4749, 1995). Por ejemplo, se conoce el motivo de unión para HLA-A24 en el que, en los péptidos que consisten en 8-11 residuos de aminoácidos, el aminoácido en la posición 2 es tirosina (Tyr), fenilalanina (Phe), metionina (Met) o triptófano (Trp) y el aminoácido en la posición C-terminal es fenilalanina (Phe), leucina (Leu), isoleucina (Ile), triptófano (Trp) o metionina (Met) (J. Immunol., 152, pág. 3913, 1994, Immunogenetics, 41, pág. 178, 1995, J. Immunol., 155, pág. 4307, 1994).

Con respecto a los motivos para HLA-A2, se conocen los siguientes motivos enumerados en la Tabla 1 (Immunogenetics, 41, pág. 178, 1995; J. Immunol., 155: pág. 4749, 1995).

Tabla 1

Tipo de HLA-A2	Segundo aminoácido a partir del extremo N	Aminoácido en el extremo C
HLA-A0201	L, M	V, L
HLA-A0204	L	L
HLA-A0205	V, L, I, M	L
HLA-A0206	V, Q	V, L
HLA-A0207	L	L
Longitud del péptido = 8 - 11 aminoácidos		

Recientemente, se ha hecho posible buscar secuencias peptídicas que se espera que sean capaces de unirse a antígenos HLA mediante internet utilizando el programa BIMAS; NIH (http://bimas.dert.nih.gov/molbio/hla_bind/). También es posible buscar secuencias peptídicas utilizando análisis de predicción de unión de péptido HLA BIMAS (J. Immunol., 152, 163, 1994). Los ejemplos específicos de péptidos derivados de WT1 que se han buscado e identificado de tal manera son los enumerados en la Tabla II - Tabla XLVI del documento WO2000/18795.

Los péptidos derivados de WT1 anteriormente mencionados pueden alterarse parcialmente por sustitución, delección y/o adición de uno o varios residuos de aminoácidos incluyendo la adición de uno o varios residuos de aminoácidos en el extremo N y/o C-terminal del péptido, preferiblemente, por sustitución de uno o varios residuos de aminoácidos. La sustitución se lleva a cabo preferiblemente con un residuo de aminoácido disponible a la vista de los motivos mencionados anteriormente.

Un péptido antigénico canceroso derivado de WT1 puede seleccionarse sometiendo los péptidos derivados de WT1 (incluyendo las variantes) a un ensayo conocido para péptido antigénico canceroso, por ejemplo, un método descrito en el documento WO 02/47474 o Int. J. Cancer: 100, 565-570 (2002).

Los ejemplos específicos de los péptidos antigénicos cancerosos derivados de WT1 incluyen los siguientes péptidos.

Cys Met Thr Trp Asn Gln Met Asn Leu (SEC ID NO: 2)
 Cys Tyr Thr Trp Asn Gln Met Asn Leu (SEC ID NO: 3)
 Arg Met Phe Pro Asn Ala Pro Tyr Leu (SEC ID NO: 4)
 Arg Tyr Pro Ser Cys Gln Lys Lys Phe (SEC ID NO: 5)
 Ser Tyr Thr Trp Asn Gln Met Asn Leu (SEC ID NO: 6)
 Ala Tyr Thr Trp Asn Gln Met Asn Leu (SEC ID NO: 7)
 Abu Tyr Thr Trp Asn Gln Met Asn Leu (SEC ID NO: 8)
 Arg Tyr Thr Trp Asn Gln Met Asn Leu (SEC ID NO: 9)
 Lys Tyr Thr Trp Asn Gln Met Asn Leu (SEC ID NO: 10)
 Arg Tyr Phe Pro Asn Ala Pro Tyr Leu (SEC ID NO: 11)
 Arg Tyr Pro Gly Val Ala Pro Thr Leu (SEC ID NO: 12)
 Ala Tyr Leu Pro Ala Val Pro Ser Leu (SEC ID NO: 13)
 Asn Tyr Met Asn Leu Gly Ala Thr Leu (SEC ID NO: 14)
 Arg Val Pro Gly Val Ala Pro Thr Leu (SEC ID NO: 15)
 Arg Tyr Pro Ser Ser Gln Lys Lys Phe (SEC ID NO: 16)
 Arg Tyr Pro Ser Ala Gln Lys Lys Phe (SEC ID NO: 17)
 Arg Tyr Pro Ser Abu Gln Lys Lys Phe (SEC ID NO: 18)

En lo anterior, "Abu" se refiere a "ácido α -aminoacético".

Entre ellos, los péptidos mostrados en el SEC ID NO: 2 y el SEC ID NO: 4 son péptidos de unión al antígeno HLA-A24 y al antígeno HLA-A2 y los otros péptidos mostrados en los SEC ID NO: 3, 5, 6 -18 son péptidos de unión al antígeno HLA-A24.

El péptido antigénico canceroso preferido puede seleccionarse de los mostrados en los SEC ID NO: 2, 3, 4 y 5 anteriormente.

Un tetrámero de HLA puede contener dos o más péptidos entre los anteriormente mencionados.

La síntesis de un péptido se puede llevar a cabo de acuerdo con los procedimientos generalmente utilizados en el campo de la química de péptidos. Un método tal puede hallarse en la bibliografía incluyendo Peptide Synthesis, Interscience, Nueva York, 1966; The Proteins, Vol. 2, Academic Press Inc., Nueva York, 1976; Peptide Synthesis, Maruzen, Inc., 1975; Peptide-Gosei no Kiso to Jikken, Maruzen, Inc., 1985; e Iyakmihin no Kaihatsu (Zoku), Vol. 14, Peptide Synthesis, Hirokawa-syoten, 1991.

Asimismo la descripción incluye péptidos en los que el grupo amino del aminoácido N-terminal o el grupo carboxilo del aminoácido C-terminal de los péptidos anteriormente descritos está modificado.

Los péptidos que experimentan dicha modificación también quedan dentro del alcance de la descripción.

Los ejemplos de un grupo para la modificación del grupo amino del aminoácido N-terminal incluyen 1 a 3 grupos seleccionados entre un grupo alquilo C1-C6, un grupo fenilo, un grupo cicloalquilo y un grupo acilo, específicamente, un grupo alcanilo C1-C6, un grupo alcanilo C1-C6 sustituido con un grupo fenilo, un grupo carbonilo sustituido con un grupo cicloalquilo C5-C7, un grupo alquil(C1-C6)sulfonilo, un grupo fenilsulfonilo, un grupo alcoxi(C2-C6)carbonilo, un grupo alcocarbonilo sustituido con un grupo fenilo, un grupo carbonilo sustituido con un grupo cicloalcoxi C5-C7 y un grupo fenoxicarbonilo y similares.

Los ejemplos de un grupo para la modificación de grupo carboxilo del aminoácido C-terminal incluyen un grupo éster y un grupo amida. El grupo éster incluye específicamente un grupo alquil éster C1-C6, un grupo alquil éster C0-C5

sustituido con un grupo fenilo y un grupo cicloalquiléster C5-C7 y similares. El grupo amida incluye específicamente un grupo amida, un grupo amida sustituido con uno o dos grupos alquilo C1-C6, un grupo amida sustituido con uno o dos grupos alquilo C0-C6 que están sustituidos con un grupo fenilo y un grupo amida que forma un azacicloalcano de 5 a 7 miembros que incluye un átomo de nitrógeno de un grupo amida y similares.

5 En cuanto al antígeno HLA (cadena α del antígeno HLA), que es un componente del tetrámero de HLA, se puede utilizar un antígeno HLA de cualquier subtipo; sin embargo, es necesario usar un antígeno HLA del mismo subtipo que el del sujeto que se va a diagnosticar o seleccionar. Los ejemplos de antígeno HLA incluyen antígeno HLA-A24 tal como HLA-A*2402, etc.; antígeno HLA-A2 tal como HLA-A*0201, -A*0204, -A*0205, -A*0206, etc.; antígeno HLA-A26 tal como HLA-A*2601, etc.; y HLA-A*3101, HLA-A*3303, HLA-A*1101, y similares. Los ejemplos específicos incluyen antígeno HLA-A24, antígeno HLA-A2 y antígeno HLA-A26. Las secuencias de nucleótidos y aminoácidos de estos antígenos de HLA son conocidas. Por ejemplo, las secuencias para el antígeno HLA-A24 se describen en Cancer Res., 55: 4248-4252 (1995) y número de acceso de Genbank M64740; las del antígeno HLA-A2 en el número de acceso de Genbank M84379; y las del antígeno HLA-A26 en el número de acceso de Genbank D 14350. En consecuencia, puede clonarse fácilmente una cadena α de antígeno HLA basándose en la información referente a estas secuencias de bases conocidas de una manera convencional tal como PCR.

La cadena α de dicho antígeno HLA es preferiblemente un fragmento en forma soluble para facilitar la unión y la selección de CTL. Se prefiere adicionalmente que el extremo C-terminal de la cadena α de dicho antígeno HLA tenga una estructura viable para que la biotilación permita la tetramerización mediante la unión a biotinavidina, es decir, tiene una porción de unión a biotina añadida.

Específicamente, en el caso de HLA-A2402 (un tipo de HLA-A24), se prepara ADNc para una cadena α de HLAA*2402 soluble recombinante que se diseña para permitir que el residuo de lisina específico de la etiqueta C-terminal sea biotilado por la enzima BirA mediante reacción de PCR utilizando, como molde, un plásmido de expresión de HLAA*2402 (número de acceso de GenBank M64740) y, como cebador directo: 5'-CCATGGGCAGCCATTCTATGCGCTATTTTTCTACCTCCGT-3' (SEC ID NO: 19); y, como cebador inverso: 5'-GGATCCTGGCTCCCATCTCAGGGTGAGGGGCTTGGGCAGACCCTC-3' (SEC ID NO: 20).

30 En cuanto a la β 2-microglobulina que es un componente de tetrámero de HLA, se prefiere la β 2-microglobulina humana. El ADNc para dicha β 2-microglobulina humana se puede preparar mediante una reacción de PCR utilizando, como molde, un plásmido de expresión de β 2-microglobulina humana (número de acceso de GenBank AB021288) y, como un cebador directo: 5'-CATATGATCCAGCGTACCCCGAAAATTCAG-3' (SEC ID NO: 21); y, como cebador inverso: 5'-GGATCCTTACATGTCTCGATCCCCTAAC-3' (SEC ID NO: 22).

En cuanto a la avidina que es un componente del tetrámero de HLA, se puede utilizar cualquier avidina conocida hasta ahora. Sin embargo, se prefiere que dicha avidina esté marcada con fluorescencia para facilitar la detección mediante citometría de flujo o microscopía fluorescente y similares. Se puede utilizar cualquier pigmento fluorescente conocido sin limitación, por ejemplo, ficoeritrina (PE), isotiocianato de fluoresceína (FITC), proteína peridínil clorofila (PerCP), alofocianina (APC), ficoeritrina-texasred (también denominada ECD) y ficoeritrina-cianina 5.1 (también denominada PC5) o similares.

El procedimiento para la preparación de los tetrámeros de HLA que comprenden esos componentes para un tetrámero de HLA es bien conocido como se ha descrito en la bibliografía (Science 279: 2103-2106 (1998), Science 274: 94-96 (1996), etc.). La preparación se describirá en lo sucesivo en este documento de forma breve.

En primer lugar, una célula anfitriona apropiada tal como células de E. coli o de mamífero capaces de expresar una proteína se transforma con un vector de expresión de la cadena α de HLA y un vector de expresión de β 2-microglobulina y se permite que se exprese. Se utiliza aquí preferiblemente E. coli (por ejemplo, BL21). El complejo de HLA monomérico resultante y un péptido antigénico (péptido antigénico canceroso derivado de WT1) se mezclan a continuación para formar un complejo de péptido-HLA soluble. La secuencia C-terminal de la cadena α de HLA del complejo de péptido-HLA resultante se biotila con la enzima BirA. Cuando se mezclan un complejo de péptido-HLA biotilado y una avidina marcada con fluorescencia a una razón molar de 4:1, se forma un tetrámero de HLA. Se prefiere purificar la proteína resultante mediante filtración en gel o similar en cada etapa anterior.

La etapa (a) anterior se lleva a cabo poniendo en contacto un tetrámero de HLA preparado como se ha mencionado anteriormente con una muestra biológica (una muestra biológica que contiene precursores de CTL aislados de un sujeto de ensayo). El contacto se lleva a cabo preferiblemente a 37°C. Además, el contacto se lleva a cabo preferiblemente en un tampón biológico normal tal como suero que contiene tampón de fosfato (PBS).

Se prefiere preparar un control negativo llevando a cabo los mismos procedimientos en paralelo utilizando estreptavidina marcada con fluorescencia en lugar de tetrámero de HLA.

En la etapa (b) después de la etapa (a), se mide la frecuencia de existencia o la cantidad de células precursoras de CTL específicos de WT1 unidas a un tetrámero de HLA. La medición se puede llevar a cabo por medio de cualquiera de los métodos conocidos hasta ahora. Cuando un tetrámero de HLA está marcado con fluorescencia, las células precursoras de CTL unidas al tetrámero de HLA también están marcadas con fluoresceína. Los CTL marcados de este modo pueden detectarse o aislarse mediante citometría de flujo o microscopía fluorescente.

La frecuencia de existencia de células precursoras de CTL específicos de WT1 unidas a tetrámero de HLA puede obtenerse, por ejemplo, midiendo la proporción (frecuencia) de células unidas a tetrámero de HLA entre células positivas para CD8 (células precursoras de CTL positivas para CD8) o células positivas para CD8/CD3 (células precursoras de CTL positivas para CD8/CD3).

Las células positivas para CD8 se pueden marcar y detectar utilizando, por ejemplo, anticuerpo monoclonal anti CD8 humano de ratón marcado con fluorescencia. Las células positivas para CD3 se pueden marcar y detectar utilizando, por ejemplo, anticuerpo monoclonal anti-CD3 humano de ratón marcado con fluorescencia.

Debe usarse aquí un pigmento fluorescente diferente del utilizado en el tetrámero de HLA. Es decir, se deben utilizar pigmentos fluorescentes distintos entre sí, por ejemplo, cuando se utiliza el tetrámero de HLA marcado con PE, se puede utilizar anticuerpo monoclonal anti-CD8 humano de ratón marcado con FITC y anticuerpo monoclonal anti-CD3 humano de ratón marcado con PerCP.

El procedimiento concreto comprende, cuando se mide la proporción (frecuencia) de células unidas a tetrámero de HLA para determinar las células positivas para CD8, por ejemplo, poner en contacto el tetrámero de HLA marcado con PE con una muestra biológica, añadir anticuerpo monoclonal anti-CD8 humano de ratón marcado con FITC, permitir que la mezcla reaccione y analizar las células teñidas por medio de citometría de flujo o microscopía de fluorescencia. Se seleccionan las células positivas para CD8 (CD8⁺). La proporción (frecuencia) de células precursoras de CTL específicos para péptido antigénico de WT1 se puede calcular restando la proporción de células positivas para avidina (CD8⁺avidina⁺) como un control negativo de la proporción de células positivas para el tetrámero (CD8⁺tetrámero⁺) en las células CD8⁺ seleccionadas, como sigue:

$$\text{Células precursoras de CTL específicos para péptido antigénico de WT1 (\%)} = 100 \times \left\{ \frac{(\text{células CD8}^+ \text{ tetrámero}^+) / (\text{células CD8}^+) - [(\text{células CD8}^+ \text{ avidina}^+) / (\text{células CD8}^+)]}{1} \right\}$$

Cuando se mide la proporción (frecuencia) de células unidas al tetrámero de HLA para determinar las células positivas para CD8 y CD3, por ejemplo, poniendo en contacto el tetrámero de HLA marcado con PE con una muestra biológica, añadiendo anticuerpo monoclonal anti-CD8 humano de ratón marcado con FITC y anticuerpo anti-CD3 humano de ratón marcado con PerCP, permitiendo que la mezcla reaccione y analizando las células teñidas mediante citometría de flujo o microscopía fluorescente, se seleccionan las células positivas para CD3 y CD8 (CD3⁺CD8⁺). La proporción (frecuencia) de células precursoras de CTL específicos para el péptido antigénico de WT1 se puede calcular restando la proporción de células positivas para avidina (CD3⁺CD8⁺avidina⁺) como control negativo de la proporción de células positivas para el tetrámero (CD3⁺CD8⁺tetrámero⁺) en las células CD3⁺CD8⁺ seleccionadas, como sigue:

$$\text{Células precursoras de CTL específicos de péptido antigénico de WT1 (\%)} = 100 \times \left\{ \frac{(\text{células CD3}^+ \text{ CD8}^+ \text{ tetrámero}^+) / (\text{células CD3}^+ \text{ CD8}^+) - [(\text{células CD3}^+ \text{ CD8}^+ \text{ avidina}^+) / (\text{células CD3}^+ \text{ CD8}^+)]}{1} \right\}$$

La sensibilidad a la vacuna de WT1 se evalúa basándose en los resultados obtenidos por la medición anterior. Específicamente, esto se puede llevar a cabo comparando la frecuencia de existencia o la cantidad de células precursoras de CTL específicos de WT1 en un sujeto de ensayo obtenido en la etapa (a) (referido de aquí en adelante como "valor de sujeto de ensayo") con la de sujeto sano (referido de aquí en adelante como "valor de sujeto sano") y decidiendo la diferencia entre ellas. En este caso, se necesita un material biológico aislado y preparado a partir de un sujeto sano (sangre, fluido linfático, PBMC, etc.), que se puede obtener recogiendo una muestra biológica de un sujeto que no tenga cáncer. Según se utiliza en la presente memoria "sujeto sano" significa una persona a la que no se le ha diagnosticado cáncer.

La comparación entre los valores de sujeto de ensayo y los valores de sujeto sano se puede llevar a cabo midiendo la muestra biológica de un sujeto de ensayo y la de un sujeto sano en paralelo. Cuando no se realiza la comparación en paralelo, la comparación también se puede llevar a cabo utilizando un valor medio o un valor intermedio estadístico de valores de sujeto sano calculados a partir de los valores de sujeto sano obtenidos midiendo muestras biológicas plurales (al menos dos, preferiblemente tres o más, más preferiblemente cinco o más) de un sujeto sano en condiciones contantes cuando no se realiza medición paralela.

La evaluación de si un sujeto de ensayo es o no altamente sensible a vacuna de WT1 se puede llevar a cabo utilizando como indicador que el valor de sujeto de ensayo sea 1,5 veces o más, preferiblemente 2 veces o mayor en comparación con el valor del sujeto sano. Es decir, cuando el valor del sujeto de ensayo es 1,5 veces o más,

preferiblemente, 2 veces o mayor el valor del sujeto sano, se evalúa que la sensibilidad a la vacuna de WT1 es alta. Se considera que un paciente que se ha evaluado que es altamente sensible a la vacuna de WT1 es adecuado para vacuna de WT1, en otras palabras, es posible aplicar preferiblemente terapia de vacuna de WT1 al paciente.

5 El método para seleccionar pacientes como se ha descrito anteriormente también se puede utilizar no solamente en la evaluación de pacientes antes de la administración de vacunas sino también para el diagnóstico o la confirmación de la eficacia después de la administración de vacuna.

10 También se describe un método para seleccionar un paciente altamente sensible a la vacuna de WT1, que comprende las siguientes etapas (a) y (b):

- (a) medir la frecuencia de existencia o la cantidad de células precursoras de CTL específicos de WT1 de tipo efector en la muestra biológica que contiene las células precursoras de CTL de un sujeto de ensayo; y
- (b) decidir si valor de (a) medido es o no elevado en comparación con el de un sujeto sano, y evaluar la

15 un método de tratamiento del cáncer en el paciente seleccionado mediante dicho método.

20 Las células precursoras de CTL específicos de WT1 se clasificaron con precisión con respecto a función y se descubrió que, en particular, las células precursoras de CTL de tipo efector existen en mayor proporción en comparación con los individuos sanos. En consecuencia, pueden seleccionarse pacientes altamente sensibles a la vacuna de WT1 basándose en la cantidad o frecuencia de células precursoras de CTL específicos de WT1 de tipo efector como indicador. El método de selección que usa células precursoras de CTL de tipo efector como indicador puede ser útil para llevar a cabo un análisis más detallado, cuando hay pocas o ninguna diferencia entre los valores

25 de un sujeto de ensayo y los de un sujeto sano cuando se miden por medio del método de selección que utiliza la frecuencia de existencia o la cantidad de células precursoras de CTL como indicador.

Un ejemplo específico de un método de selección comprende las siguientes etapas (a), (b) y (c):

- (a) poner en contacto un tetrámero de HLA que comprende un péptido antigénico tumoral derivado de WT1, un anticuerpo anti-CD8, un anticuerpo anti-CD45RA y un anticuerpo anti-CD27 con la muestra biológica que contiene las células precursoras de CTL de un sujeto de ensayo;
- (b) medir la proporción de células precursoras de CTL positivas para CD45RA y negativas para CD27 de tipo efector entre las células precursoras de CTL que son positivas para CD8 o CD8/CD3 y positivas para la unión a tetrámero de HLA; y
- (c) decidir si el valor medido de (b) es alto o no en comparación con el de un sujeto sano, y evaluar la

40 un método de tratamiento del cáncer en el paciente seleccionado mediante dicho método.

Según se utiliza en la presente memoria, el término "célula efectora" significa célula precursora de CTL positiva para CD45RA y negativa para CD27. La frecuencia de dichas células efectoras puede obtenerse midiendo la proporción de células precursoras de CTL positivas para CD45RA y negativas para CD27 entre células precursoras de CTL. Específicamente se puede llevar a cabo poniendo en contacto una muestra de ensayo con un tetrámero de HLA, un anticuerpo anti-CD8, un anticuerpo anti-CD45RA y un anticuerpo anti-CD27; y midiendo la proporción de células

45 positivas para CD45RA y negativas para CD27 entre las células precursoras de CTL (células precursoras de CTL específicos de WT1) que son positivas para CD8 o CD8/CD3 y positivas para unión al tetrámero de HLA.

50 Las células positivas para CD45RA se pueden marcar y detectar utilizando, por ejemplo, anticuerpo monoclonal anti-CD45RA humano de ratón marcado con fluorescencia. Las células positivas para CD27 se pueden marcar y detectar utilizando, por ejemplo, anticuerpo monoclonal anti-CD27 humano de ratón marcado con fluorescencia. Un pigmento fluorescente utilizado aquí debe ser diferente del utilizado en el tetrámero de HLA, el anticuerpo anti-CD8 o el anticuerpo anti-CD3. Es decir, se deben utilizar pigmentos fluorescentes distintos entre sí, por ejemplo, cuando se usan tetrámeros de HLA marcado con PE, anticuerpo monoclonal anti-CD8 marcado con FITC y anticuerpo

55 monoclonal anti-CD3 marcado con Per, se pueden utilizar anticuerpo monoclonal anti-CD45RA humano de ratón marcado con ECD y anticuerpo monoclonal anti-CD27 humano de ratón marcado con PC5. Estos anticuerpos marcados pueden obtenerse de Beckman Coulter, y similares.

60 El procedimiento concreto para medir las células precursoras o similares se puede llevar a cabo de una manera similar al método de selección descrito anteriormente en el que la frecuencia de existencia o la cantidad de células precursoras de CTL se utiliza como indicador.

El método para seleccionar pacientes altamente sensibles a la vacuna de WT1 como se ha descrito anteriormente también es aplicable al diagnóstico del cáncer. Se descubrió que la frecuencia de células precursoras de CTL

específicos de WT1 es mayor en pacientes de tumor maligno hematopoyético o cáncer de pulmón en comparación con individuos sanos. En consecuencia, es posible diagnosticar cáncer utilizando la frecuencia de células precursoras de CTL específicos de WT1 o células precursoras de CTL específicos de WT1 de tipo efector como indicador. Los ejemplos de cáncer que se pueden diagnosticar incluyen cánceres de sangre tales como leucemia, síndrome mielodisplásico, mieloma múltiple y linfoma maligno, y cánceres sólidos tales como cáncer gástrico, cáncer de colon, cáncer de pulmón, cáncer de mama, cáncer embrionario, cáncer hepático, cáncer de piel, cáncer de vejiga, cáncer de próstata, cáncer uterino, cáncer cervical y cáncer ovárico. Los ejemplos preferidos son leucemia, síndrome mielodisplásico y cáncer de pulmón.

La descripción también describe un método para identificar una molécula diana de vacuna de WT1 siendo dicha molécula característica de un paciente, que comprende las siguientes etapas (a), (b) y (c):

(a) aplicar cada una de moléculas diana plurales de la vacuna de WT1 a una muestra biológica que contiene las células precursoras de CTL de un paciente de ensayo;

(b) medir la frecuencia de existencia o la cantidad de células precursoras de CTL específicos de WT1 en las respectivas muestras biológicas de (a) y comparar los resultados entre sí; y

(c) identificar la molécula diana de la vacuna de WT1 eficaz para el paciente de ensayo basándose en los resultados obtenidos en (b).

Se ha descubierto que existen células precursoras de CTL específicos de WT1 en un paciente antes de la administración de la vacuna con una frecuencia superior a la conocida hasta ahora. En consecuencia, es posible identificar una molécula diana (molécula diana para uso terapéutico) de la vacuna de WT1 siendo dicha molécula característica de un paciente basándose en la cantidad o frecuencia de células precursoras de CTL específicos de WT1 como indicador.

Es decir, el método de identificación anterior se puede utilizar de forma eficaz para identificar la molécula diana más adecuada (péptido antigénico) para tratar un paciente que se ha considerado que es altamente sensible a la vacuna de WT1.

Específicamente, la identificación se puede llevar a cabo, de forma similar al método de selección de pacientes altamente sensibles a la vacuna de WT1, midiendo la frecuencia de existencia o la cantidad de células precursoras de CTL específicos de WT1 utilizando el método del monómero de HLA, el método del dímero de HLA, el método del tetrámero de HLA, el método del pentámero de HLA, el método ELISPOT, la técnica de RT-PCR en tiempo real o el método de dilución limitante. Preferiblemente, se utiliza el método del monómero de HLA, el método del dímero de HLA, el método del tetrámero de HLA o el método de pentámero de HLA. El método de identificación se describirá a continuación en este documento tomando concretamente el método de tetrámero de HLA como ejemplo.

El método que implica el método del tetrámero de HLA comprende las siguientes etapas (a), (b) y (c):

(a) poner en contacto cada uno de los tetrámeros de HLA plurales que comprenden diferentes péptidos antigénicos tumorales derivados de WT1 con la muestra biológica que contiene las células precursoras de CTL de un paciente de ensayo;

(b) medir la frecuencia de existencia o la cantidad de células precursoras de CTL específicos de WT1 unidas a los tetrámeros de HLA respectivos y comparar los resultados entre sí; y

(c) identificar un péptido antigénico tumoral derivado de WT1 eficaz para el paciente de ensayo basándose en los resultados obtenidos en (b).

Específicamente, se preparan tetrámeros de HLA plurales que contienen cada uno un péptido antigénico canceroso derivado de WT1 como un candidato. Después cada uno de los tetrámeros de HLA se pone en contacto con una muestra biológica aislada de un paciente de ensayo y se mide la frecuencia de existencia o la cantidad de células precursoras de CTL específicos de WT1 unidas a un tetrámero de HLA. Los valores obtenidos de tetrámeros de HLA respectivos se comparan y se identifica un péptido antigénico canceroso comprendido en el tetrámero de HLA que mostró el valor más alto, que es un péptido antigénico canceroso que es reconocido más fácilmente por los CTL, como molécula diana para la terapia con la vacuna de WT1 para el paciente, es decir, la molécula diana característica del paciente.

Se puede utilizar cualquier péptido antigénico canceroso siempre que derive de WT1 y los ejemplos incluyen los péptidos antigénicos cancerosos mostrados en los SEC ID NO: 2 a 18. El péptido antigénico canceroso preferido es el que se muestra en uno cualquiera de SEC ID NO: 2-5.

El procedimiento concreto de las etapas o métodos respectivos de preparación para cada componente puede hallarse en la sección anterior con respecto a un método de selección de un paciente altamente sensible a la vacuna de WT1.

De acuerdo con el presente método para identificar una molécula diana de la vacuna de WT1, es posible identificar una molécula diana capaz de tratar un cáncer característico de un paciente. Por lo tanto, la descripción describe una composición farmacéutica para tratar el cáncer en un paciente dado, que comprende una molécula diana identificada mediante el método de identificación de una molécula diana de la vacuna de WT1 siendo dicha molécula característica del paciente; y un método de tratamiento del cáncer característico de un paciente, que comprende administrar al paciente la molécula diana identificada por medio del método de identificación. La composición farmacéutica de la descripción comprende la vacuna contra el cáncer y puede contener un coadyuvante y similares que se conocen en la técnica.

La presente descripción describe adicionalmente un agente de diagnóstico clínico para seleccionar un paciente altamente sensible a la vacuna de WT1, que comprende como ingrediente un monómero de HLA, un dímero de HLA, un tetrámero de HLA o un pentámero de HLA que contienen cada uno un péptido antigénico tumoral derivado de WT1. El agente de diagnóstico clínico de la descripción se describirá a continuación en este documento tomando el tetrámero de HLA como ejemplo.

El "tetrámero de HLA" como ingrediente del agente de diagnóstico clínico de la descripción se refiere a, como se ha mencionado anteriormente, un tetrámero preparado por biotinilación de un complejo (monómero de HLA) obtenido por asociación de una cadena α de antígeno HLA y una β 2-microglobulina con un péptido antigénico canceroso derivado de WT1, y permitiendo la unión a avidina para la tetramerización (Science 279: 2103-2106 (1998); y Science 274: 94-96 (1996)).

Se puede utilizar cualquier péptido antigénico canceroso aquí siempre que derive de WT1 y los ejemplos incluyen los péptidos antigénicos cancerosos mostrados en los SEC ID NO: 2 a 18. El péptido antigénico canceroso preferido es el mostrado en uno cualquiera de los SEC ID NO: 2-5.

El procedimiento de las etapas o métodos respectivos de preparación para cada componente se puede encontrar en la sección anterior con respecto al método de selección un paciente altamente sensible a la vacuna de WT1.

El agente de diagnóstico clínico de la descripción puede ser un componente de un kit para seleccionar un paciente altamente sensible a la vacuna de WT1. El kit puede ser el que está compuesto de un agente de diagnóstico clínico solo de la descripción o el que está compuesto de un agente de diagnóstico clínico de la presente descripción y otro ingrediente o ingredientes. Los ejemplos de otros ingredientes en el kit incluyen estreptavidina marcada con fluorescencia, anticuerpo monoclonal anti-CD8 humano de ratón marcado con fluorescencia, anticuerpo monoclonal anti-CD3 humano de ratón marcado con fluorescencia y similares. Cuando se detectan células efectoras, el kit puede contener anticuerpo monoclonal anti-CD45RA humano de ratón marcado con fluorescencia, anticuerpo monoclonal anti-CD27 humano de ratón marcado con fluorescencia.

Los ejemplos de los pigmentos fluorescentes incluyen ficoeritrina (PE), isotiocianato de fluoresceína (FITC), proteína de peridinin clorofila (PerPC), alofocianina (APC), ficoeritrina-texasred (también llamado ECD), y ficoeritrina-cianina 5.1 (también llamado PC5) y similares.

El agente de diagnóstico clínico y un kit de la descripción pueden usarse en la selección no solamente de un paciente altamente sensible a la vacuna de WT1 sino también una molécula diana de vacuna de WT1 (molécula diana para tratamiento). Además, el agente se puede utilizar como un agente de diagnóstico para el cáncer sin cambiar los componentes.

La descripción también proporciona un método para determinar la idoneidad de un paciente para la vacuna de WT1, que comprende las siguientes etapas (a) y (b):

- (a) medir la frecuencia de existencia o la cantidad de CTL específicos de WT1 en la muestra biológica que contiene los CTL de un paciente después de la administración de la vacuna de WT1;
- (b) decidir si el valor medido de (a) es o no elevado en comparación con el de una muestra biológica obtenida antes de la administración de vacuna de WT1, y evaluar si el paciente es adecuado para la terapia con la vacuna de WT1, y

un método para tratar el cáncer en un paciente, que comprende tratar al paciente que se considera que es adecuado por medio del método de determinación con WT1 o un péptido antigénico canceroso derivado de WT1.

Como se describe más abajo en los ejemplos, se midió la frecuencia de los CTL específicos de WT1 en pacientes que se someten a tratamiento con un péptido antigénico tumoral derivado de WT1 ("vacuna de WT1") y se descubrió que el efecto terapéutico se correlaciona con el aumento de frecuencia de CTL después de la administración del péptido en relación con la obtenida antes de la administración del mismo. Es decir, el caso en el que la frecuencia de existencia de CTL específicos de WT1 después de la administración del péptido WT1 es 1,5 veces o mayor en comparación con la de la muestra obtenida antes de la administración se define como "respuesta inmunitaria

positiva" y se investigó la relación entre la inmunosensibilidad y el efecto terapéutico. Como resultado se reconoció una correlación positiva entre la inmunosensibilidad y el efecto terapéutico. Este resultado reveló que es posible evaluar si el tratamiento con la vacuna de WT1 es adecuado o no para un paciente objeto basándose en la inmunosensibilidad anteriormente mencionada (aumento de la frecuencia o aumento de CTL) como indicador.

5 Por lo tanto, el método de determinación descrito en la presente memoria se puede utilizar de forma eficaz para evaluar la idoneidad del tratamiento para un paciente que se somete a terapia con vacuna de WT1, por ejemplo, la idoneidad del tratamiento continuo con la administración del péptido.

10 Los procedimientos concretos de la etapa (a) del método de determinación se pueden encontrar en la sección anterior con respecto al "método de selección de un paciente altamente sensible a la vacuna de WT1". Específicamente, se puede llevar a cabo midiendo la frecuencia de existencia o la cantidad de CTL específicos de WT1 por medio del método del monómero de HLA, el método del dímero de HLA, el método del tetrámero de HLA, el método del pentámero de HLA, el método ELISPOT, la técnica de RT-PCR en tiempo real, el método de dilución limitante o similares.

15 La evaluación de si un paciente es adecuado o no para terapia con vacuna de WT1 en la etapa (b) se lleva a cabo comparando la frecuencia de existencia o la cantidad de CTL específicos de WT1 obtenidos del paciente después de la administración de la vacuna de WT1 (referido de aquí en adelante como "valor de post-administración") y la obtenida antes de la administración de la vacuna de WT1 (referido de aquí en adelante como "valor de preadministración") y decidiendo la diferencia entre ambos valores.

20 Según se utiliza en la presente memoria, "después de la administración de la vacuna" se refiere a cualquier momento (temporización) después de una o más veces de administración de la vacuna de WT1. Sin embargo, en el caso del programa de dosificación del péptido con un intervalo de dos semanas, el tiempo preferido (temporización) es después de la primera a la quinta administración de la vacuna de WT1, preferiblemente, después de la primera a la tercera administración de la vacuna de WT1.

25 La evaluación de si el tratamiento con la vacuna de WT1 es adecuado o no se puede llevar a cabo utilizando como indicador que el valor de post-administración sea 1,5 veces o mayor en comparación con el valor de pre-administración. Es decir, cuando el valor de post-administración es 1,5 veces o mayor que el valor de pre-administración, se considera que el tratamiento con la vacuna de WT1 es adecuado. Basándose en estos hallazgos, la presente invención también proporciona un método para tratar el cáncer en un paciente, que comprende tratar a un paciente que se ha considerado que es adecuado por medio del método de determinación de la idoneidad de un paciente para la vacuna de WT1 de la presente invención con WT1 o un péptido antigénico tumoral derivado de WT1.

30 Entre los métodos anteriormente mencionados de medición de CTL, se prefieren principalmente el método del monómero de HLA, el método del dímero de HLA, el método del tetrámero de HLA y método del pentámero de HLA desde el punto de vista de la facilidad de manipulación y la precisión. El método de determinación se describirá a continuación en este documento tomando el método del tetrámero de HLA como ejemplo.

El método que implica el método del tetrámero de HLA comprende las siguientes etapas (a), (b) y (c):

45 (a) poner en contacto un tetrámero de HLA que comprende un péptido antigénico tumoral derivado de WT1 con la muestra biológica que contiene los CTL de un paciente después de la administración de la vacuna de WT1;
 (b) medir la frecuencia de existencia o la cantidad de CTL específicos de WT1 unidos al tetrámero de HLA; y
 (c) decidir si el valor medido de (b) es o no elevado en comparación con el de la muestra biológica obtenida antes de la administración de la vacuna de WT1 y evaluar si el paciente es adecuado para la terapia con la
 50 vacuna de WT1.

El antígeno HLA utilizado aquí como componente del tetrámero de HLA incluye un antígeno HLA-A24 o un antígeno HLA-A2.

55 Los ejemplos del péptido antigénico canceroso como componente de un tetrámero de HLA incluyen: Cys Met Thr Trp Asn Gln Met Asn Leu (SEC ID NO: 2), Cys Tyr Thr Trp Asn Gln Met Asn Leu (SEC ID NO: 3), Arg Met Phe Pro Asn Ala Pro Tyr Leu (SEC ID NO: 4) y Arg Tyr Pro Ser Cys Gln Lys Lys Phe (SEC ID NO: 5). Como todos los péptidos mostrados en SEC ID NO: 2-5 son péptidos capaces de unirse a HLA-A24, los ejemplos del tetrámero de HLA utilizado en el método mencionado anteriormente para determinación incluyen tetrámeros de HLA que comprenden uno cualquiera de los péptidos mostrados en los SEC ID NO: 2-5 y un antígeno HLA-A24. Además, como los péptidos mostrados en SEC ID NO: 2 y 4 también son capaces de unirse al antígeno HLA-A2, también se incluyen tetrámeros de HLA que comprenden un péptido mostrado en el SEC ID NO: 2 ó 4 y un antígeno HLA-A2.

En el método de determinación o tratamiento descritos en la presente memoria se prefiere usar un tetrámero de HLA que comprende el mismo péptido que el utilizado en el tratamiento o un péptido con el que los CTL muestran reacción cruzada, habiéndose inducido dichos CTL por el péptido utilizado en el tratamiento. Por ejemplo, cuando un péptido mostrado en el SEC ID NO: 3 se utiliza en el tratamiento de un paciente, se utiliza un tetrámero de HLA que comprende un péptido mostrado en los SEC ID NO: 2 ó 3 y un antígeno HLA-A24 de forma eficaz.

Los procedimientos concretos en las etapas (a) y (b) del método de determinación o el tratamiento de la presente descripción se pueden encontrar en la sección anterior con respecto al "método de selección de un paciente altamente sensible a la vacuna de WT1". Además, la evaluación de la etapa (c) se puede llevar a cabo basándose en la comparación de los valores de pre-administración y los valores de post-administración como se ha mencionado anteriormente.

El ejemplo específico del método de determinación o tratamiento de la presente descripción se describirá a continuación en este documento.

En primer lugar, se recoge sangre de un paciente que tiene cáncer antes de la administración del péptido antigénico canceroso derivado de WT1 y se separan las PBMC (muestra de pre-administración). A continuación se recoge sangre del paciente después del tratamiento por medio de la administración del péptido y se separan las PBMC (muestra de post-administración). Se añade a las muestras de pre- y post-administración respectivas un tetrámero de HLA y la frecuencia de los CTL específicos de péptidos se mide y se calcula de acuerdo con los métodos de análisis que se describen en la sección anterior con respecto al "método para seleccionar un paciente altamente sensible a la vacuna de WT1" y el Ejemplo 3. Cuando la frecuencia de CTL en la muestra de post-administración es 1,5 veces o mayor en comparación con la de la muestra de preadministración, se considera que el tratamiento con la vacuna de WT1 es adecuado (es decir, se espera que la vacuna de WT1 sea terapéuticamente eficaz).

La descripción también describe un agente de diagnóstico clínico para determinar la idoneidad de la vacuna de WT1 que comprende como ingrediente un monómero de HLA, un dímero de HLA, un tetrámero de HLA o un pentámero de HLA que contienen cada uno un péptido antigénico canceroso derivado de WT1 y un kit que comprende dicho agente de diagnóstico clínico. Los ingredientes de dichos agentes de diagnóstico clínico y kit son los definidos en la sección anterior con respecto al "agente clínico de diagnóstico para la selección de un paciente altamente sensible a la vacuna de WT1".

Ejemplos

La presente invención se ilustra adicionalmente por medio de los siguientes ejemplos, pero no se limita a estos ejemplos en ningún aspecto.

Ejemplo 1

Preparación de células mononucleares de sangre periférica

Después de obtener el consentimiento informado, se recogió sangre de pacientes positivos para HLA-A*2402 que tenían cáncer e individuos sanos positivos para HLA-A*2402. Entre los pacientes, los que tenían tumor maligno hematopoyético fueron dieciocho que se componían de leucemia mielocítica aguda (AML) (n=11), leucemia linfática aguda (ALL) (n=2), leucemia mielocítica crónica (CML) (n=1) y síndrome mielodisplásico (MDS) (n=4); y los que tenían cáncer de pulmón fueron siete. Hubo diez individuos sanos positivos para HLA-A*2402.

En cuanto a los pacientes que tenían tumor maligno hematopoyético, se identificó una alta expresión significativa del gen WT1 en mieloma y muestras de sangre periférica una vez o más en el momento del diagnóstico o a lo largo del tratamiento. En cuanto a los pacientes que tenían cáncer de pulmón, se identificó una alta expresión significativa del gen WT1 en biopsia o muestras extraídas.

Las células mononucleares periféricas (PBMC) se separaron de la sangre recogida mediante el método de centrifugación en gradiente de densidad (Ficoll-Hypaque) y se almacenaron en nitrógeno líquido en estado congelado.

Ejemplo 2

Preparación del tetrámero de HLA

Se preparó un tetrámero que comprendía HLA-A*2402 marcado con pigmento fluorescente (Ficoeritrina; PE) utilizando un péptido de 9 aminoácidos (SEC ID NO: 2) que comprendía la secuencia de aminoácidos en la posición 235-243 de la proteína WT1 de acuerdo con el método descrito en Int. J. Cancer: 100, 565-570, 2002.

En primer lugar, se amplificó el ADNc que codificaba HLA-A2402 recombinante por PCR utilizando un plásmido de expresión de HLA-A*2402 (Núm. de acceso de GenBank M64740) como molde y un cebador directo: 5'-CCATGGGCAGCCATTCTATGCGCTATTTTTCTACCTCCGT-3' (SEC ID NO: 19); y un cebador inverso: 5'-GGATCCTGGCTCCCATCTCAGGGTGAGGGGCTTGGGCAGACCCTC-3' (SEC ID NO: 20).

El cebador inverso codifica una secuencia de reconocimiento de BirA de modo que los marcos se conforman en el extremo C-terminal. Los fragmentos amplificados se escindieron por medio de enzimas de restricción NcoI y BamH1 y se clonaron en el vector pET11d (Novagen).

Después se amplificó el ADNc que codificaba la β 2-microglobulina humana soluble recombinante utilizando un plásmido de expresión de β 2-microglobulina humana (Núm. de acceso de GenBank ABO21288) como molde y un cebador directo: 5'-CATATGATCCAGCGTACCCCGAAAATTCAG-3' (SEC ID NO: 21); y un cebador inverso: 5'-GGATCCTTACATGTCTCGATCCCACTTAAC-3' (SEC ID NO: 22).

Los fragmentos amplificados se escindieron por medio de las enzimas de restricción NdeI y BamH1 y se clonaron en un vector pET11a (Novagen).

Se permitió que los dos vectores resultantes se expresaran en E. coli BL21 y se recuperaron como fracciones insolubles de cuerpos de inclusión. Los cuerpos de inclusión respectivos se disolvieron en solución de urea 8M y se diluyeron mediante un tampón de replegamiento. Se añadió a la dilución un péptido (SEC ID NO: 2) para formar un complejo de HLA-péptido soluble. La secuencia C-terminal del complejo de HLA-péptido se biotiniló con la enzima BirA y el tetrámero de HLA-péptido biotinilado resultante se purificó mediante la técnica de filtración en gel. El complejo de HLA-péptido biotinilado y avidina marcada con PE (Molecular Probe) se mezclaron a una razón molar de 4:1 para preparar tetrámero de HLA.

Ejemplo 3

Análisis de células precursoras de CTL específicos de WT1 con tetrámero de HLA

Las PBMC congeladas obtenidas en el Ejemplo 1 se descongelaron e inmediatamente se resuspendieron en una solución salina tamponada con fosfato (PBS) que contenía suero bovino fetal al 0,5 % (FCS) a la densidad celular de 1×10^6 células/ml. Se añadió a la suspensión una solución de tetrámero (500 μ g/ μ l, 2 μ l) preparada en el Ejemplo 2. La suspensión se incubó después a 37°C durante 30 minutos. Se preparó una muestra para el control negativo tratando de una manera similar excepto que se añadió estreptavidina marcada con PE (Becton Dickinson) en lugar de tetrámero. Después de inactivar con agua helada, se añadieron anticuerpo monoclonal anti-CD8 humano de ratón marcado con FITC (15 μ l, BD Pharmingen) y anticuerpo anti-CD3 humano de ratón marcado con PerCP (15 μ l, BD Pharmingen) y la mezcla se incubó a 4°C durante 30 minutos. Las células teñidas se sometieron a lavado en centrífuga con PBS que contenía FCS al 0,5 % (2x) y se analizaron por medio del citómetro de flujo FACSort (Becton Dickinson). Se seleccionaron células positivas para CD3 y CD8 ($CD3^+CD8^+$). La proporción de células precursoras de CTL específicos de péptido antigénico de WT1 se calculó restando la proporción de células positivas para estreptavidina marcada con PE ($CD3^+CD8^+$ avidina⁺) en el control negativo de la proporción de células positivas para el tetrámero ($CD3^+CD8^+$ tetrámero⁺) en las células $CD3^+CD8^+$ seleccionadas, como sigue:

$$\text{Células precursoras de CTL específicos de péptido antigénico de WT1 (\%)} = 100 \times \left\{ \frac{(\text{células } CD3^+CD8^+\text{tetrámero}^+)}{(\text{células } CD3^+CD8^+)} - \left\{ \frac{(\text{células } CD3^+CD8^+\text{avidina}^+)}{(\text{células } CD3^+CD8^+)} \right\} \right\}$$

Los resultados del análisis de PBMC de pacientes que tienen cáncer e individuos sanos se muestran en la Tabla 2. Los resultados se representaron con respecto a las enfermedades respectivas como se muestra en la Figura 1. Estos resultados mostraron que la proporción de células precursoras de CTL específicos del péptido antigénico WT1 en células positivas para CD3/CD8 fue de 0,47 a 1,30 % (media = 0, 82 %) para individuos sanos, 1,04-29,45 % (media = 5,24 %) para pacientes que tenían tumor hematopoyético maligno y 0,33-5,97 % (media = 2,44 %) para pacientes que tenían cáncer de pulmón. El análisis estadístico reveló que la proporción aumentó significativamente ($p < 0,05$) en pacientes que tenían tumor hematopoyético maligno o cáncer de pulmón en comparación con los individuos sanos.

Tabla 2

Muestra, Núm. de paciente	Frecuencia de precursores de CTL (%)
AML, paciente Núm. 1	8,26
AML, paciente Núm. 2	8,01
AML, paciente Núm. 3	5,12
AML, paciente Núm. 4	3,84

Muestra, Núm. de paciente	Frecuencia de precursores de CTL (%)
AML, paciente Núm. 5	4,51
AML, paciente Núm. 6	3,27
AML, paciente Núm. 7	2,68
AML, paciente Núm. 8	2,60
AML, paciente Núm. 9	1,77
AML, paciente Núm. 10	1,04
AML, paciente Núm. 11	1,49
ALL, paciente Núm. 1	7,32
ALL, paciente Núm. 2	1,78
CML, paciente 1	2,46
MDS, paciente 1	29,45
MDS, paciente 2	2,99
MDS, paciente 3	2,81
MDS, paciente 4	2,08
cáncer de pulmón, paciente 1	5,97
cáncer de pulmón, paciente2	3,83
cáncer de pulmón, paciente 3	2,63
cáncer de pulmón, paciente 4	1,89
cáncer de pulmón, paciente 5	1,69
cáncer de pulmón, paciente 6	0,72
cáncer de pulmón, paciente 7	0,33
individuo sano 1	1,30
individuo sano 2	1,05
individuo sano 3	1,08
individuo sano 4	0,85
individuo sano 5	0,81
individuo sano 6	0,79
individuo sano 7	0,61
individuo sano 8	0,64
individuo sano 9	0,57
individuo sano 10	0,47
AML: leucemia mielocítica aguda ALL: leucemia linfática aguda CML: leucemia mielocítica crónica MDS: síndrome mielodisplásico	

Ejemplo 4

Análisis de frecuencia de CTL específicos de WT1 después de administración del péptido

5 El siguiente ensayo se llevó a cabo después de obtener la aprobación del comité ético de la Universidad de Osaka, Facultad de Medicina, y el consentimiento informado de los pacientes con cáncer.

Se administró un péptido que comprendía la secuencia de aminoácidos en la posición 235-243 de WT1 (SEC ID NO:

2) o su variante que comprendía el SEC ID NO: 3 en donde la metionina en la posición 2 de SEC ID NO: 2 se reemplaza por tirosina a pacientes con cáncer a 0,3 mg, 1 mg o 3 mg por organismo. El péptido se emulsionó con Montanide ISA51 (SEPPIC) y la emulsión resultante se inyectó por vía intradérmica una o varias veces a intervalos de 2 semanas. Los pacientes objeto padecían cáncer de pulmón positivo para HLA-A*2402 y positivo para WT1, cáncer de mama o leucemia.

La respuesta inmunitaria al péptido administrado se evaluó basándose en la frecuencia de CTL medida por el método de tetrámero de HLA similar al Ejemplo 3. Cuando la frecuencia de CTL específicos de péptido en cualquier etapa después de la administración del péptido aumenta 1,5 veces o más en comparación con la obtenida antes de la administración del péptido, se consideró que era una "respuesta inmunitaria positiva". Además, cuando los valores de marcador tumoral, el número de células tumorales o el volumen del tumor se redujeron, se consideró que era "terapéuticamente eficaz". La correlación entre la respuesta inmunitaria y el efecto terapéutico se evaluó por medio del ensayo de chi cuadrado en pacientes con cáncer (n=19) que se habían evaluado con respecto a la respuesta inmunitaria y el efecto terapéutico de la administración del péptido. Como resultado, ocho (73 %) de los once pacientes que eran positivos con respecto al efecto terapéutico mostraron respuesta inmunitaria positiva, mientras que solamente dos (25 %) de los ocho pacientes que eran negativos con respecto a efecto terapéutico mostraron respuesta inmunitaria positiva, lo que indica que el efecto terapéutico y la respuesta inmunitaria se correlacionan de forma positiva (P = 0,0397). Estos resultados indican que la inducción de CTL específicos para el péptido administrado es un factor importante para el efecto terapéutico. Además, la inmunosensibilidad anterior se puede utilizar como indicador para la conformación de progreso favorable del tratamiento con administración del péptido o la decisión de si el tratamiento por administración del péptido debería o no continuarse.

Ejemplo 5

Análisis de la Función de CTL específicos de WT1

Se ha indicado que los CTL específicos de péptido antigénico positivos para la tinción de tetrámero de HLA y CD8 pueden seleccionarse adicionalmente con precisión tiñendo con anticuerpo anti-CD45RA y anticuerpo anti-CD27 (J. Exp. Med., 186, pág. 1407, 1997). Las células positivas para CD45RA y positivas para CD27 se clasifican en tipo no sometidas a tratamiento previo; las células negativas para CD45RA y positivas para CD27, y negativas para CD45RA y negativas para CD27 en tipo memoria; y las células positivas para CD45RA y negativas para CD27 en tipo efector. Las células de tipo efector representan poblaciones celulares de la actividad de CTL más fuerte.

Se recogieron PBMC antes de la administración del péptido de pacientes con cáncer positivos para HLA-A*2402 (n=24; 14 cánceres de la sangre, 10 cánceres sólidos) que se sometieron a ensayo por medio de la investigación clínica del Ejemplo 4 e individuos sanos positivos para HLA-A*2402 después de obtener el consentimiento informado. Las PBMC se usaron en el análisis de función de precursores de CTL específicos del péptido WT1 que son positivos para el tetrámero de HLA, tinción y CD8. Para el análisis por citometría de flujo, las células se tiñeron de una manera similar al Ejemplo 3 con el tetrámero de HLA, el anticuerpo anti-CD8, el anticuerpo anti-CD45RA y el anticuerpo anti-CD27. Se calculó la proporción de células que pertenecían al tipo no sometido a tratamiento previo positivo para CD45RA/positivo para CD27, tipo memoria negativo para CD45RA o tipo efector positivo para CD45RA/negativo para CD27 en poblaciones celulares positivas para el tetrámero de HLA y positivas para CD8. Las proporciones para células de tipo no sometido a tratamiento previo, de tipo memoria y de tipo efector fueron 23,7 %, 45,5 % y 30,8 % para los pacientes con cáncer. En cuanto a los individuos sanos, las proporciones fueron 35,9 %, 53,8 % y 8,9 %. La comparación de pacientes con cáncer e individuos sanos mostró que la proporción de células de tipo efector es significativamente alta (P<0,05) en los pacientes con cáncer; sin embargo, no existen diferencias significativas entre los pacientes con cáncer y los individuos sanos con respecto a la proporción de células de tipo no sometido a tratamiento previo y de tipo memoria. En el Ejemplo 3, los pacientes con cáncer mostraron aumento de células precursoras de CTL específicos de WT1 y se reveló ahora que los pacientes con cáncer mostraban aumento de proporción de CTL que tenía función de tipo efector entre los CTL. Estos resultados demostraron que los pacientes con cáncer pueden diagnosticarse basándose en la frecuencia de existencia de células precursoras de CTL de tipo efector.

Aplicabilidad industrial

De acuerdo con la descripción, se describen un método para seleccionar un paciente altamente sensible a la vacuna de WT1 basándose en la frecuencia de existencia de células precursoras de CTL específicos de WT1 como indicador, un método de tratamiento del cáncer que utiliza el mismo, y agentes de diagnóstico clínico para la selección, y similares. De acuerdo con el método de selección de la descripción, se puede seleccionar un paciente que se espera que sea sensible a la terapia con vacuna de WT1, lo que hace posible tratar el cáncer de forma más apropiada.

Además, la descripción se refiere a los siguientes apartados:

1. Un método de selección de un paciente altamente sensible a la vacuna de WT1, que comprende las siguientes etapas (a), (b) y (c):
 - (a) aislar una muestra biológica que contiene las células precursoras de CTL de un sujeto de ensayo;
 - (b) medir la frecuencia de la existencia o la cantidad de células precursoras de CTL específicos de WT1 en la muestra biológica de (a); y
 - (c) decidir si el valor de (b) medido es o no elevado en comparación con el de un sujeto sano, y evaluar la sensibilidad a la vacuna de WT1.
2. El método de selección de acuerdo con el apartado 1, en donde la medición de la frecuencia de la existencia o la cantidad de células precursoras de CTL específicos de WT1 se lleva a cabo por medio de uno cualquiera del método del monómero de HLA, el método del dímero de HLA, el método del tetrámero de HLA, el método del pentámero de HLA, el método ELISPOT, la técnica de RT-PCR en tiempo real y el método de dilución limitante.
3. El método de selección de acuerdo con el apartado 2, en donde la medición se lleva a cabo por medio del método del tetrámero de HLA.
4. El método de selección de acuerdo con el apartado 3, que comprende las siguientes etapas (a), (b), (c) y (d):
 - (a) aislar una muestra biológica que contiene las células precursoras de CTL de un sujeto de ensayo;
 - (b) poner en contacto un tetrámero de HLA que comprende un péptido antigénico tumoral derivado de WT1 con la muestra biológica de (a);
 - (c) medir la frecuencia de la existencia o la cantidad de células precursoras de CTL específicos de WT1 unidas al tetrámero de HLA; y
 - (d) decidir si el valor de (c) medido es o no elevado en comparación con el de un sujeto sano, y evaluar la sensibilidad a la vacuna de WT1.
5. El método de selección de acuerdo con el apartado 4, en donde la etapa (c) de la reivindicación 4 se lleva a cabo mediante la medición de la proporción de células unidas al tetrámero de HLA entre las células precursoras de CTL positivas para CD8 o positivas para CD8/CD3.
6. El método de selección de acuerdo con el apartado 4 o 5 donde el antígeno HLA como un componente del HLA tetrámero es un antígeno HLA-A24 o un antígeno HLA-A2.
7. El método de selección de acuerdo con uno cualquiera de los apartados 4 a 6, en donde el péptido antigénico tumoral derivado de WT1 se selecciona entre los siguientes péptidos:
 - Cys Met Thr Trp Asn Gln Met Asn Leu (SEQ ID NO: 2),
 - Cys Tyr Thr Trp Asn Gln Met Asn Leu (SEQ ID NO: 3),
 - Arg Met Phe Pro Asn Ala Pro Tyr Leu (SEQ ID NO: 4) y
 - Arg Tyr Pro Gln Ser Cys Lys Lys Phe (SEQ ID NO: 5).
8. El método de selección de acuerdo con uno cualquiera de los apartados 1 a 7, que se lleva a cabo utilizando citometría de flujo.
9. El método de selección de acuerdo con uno cualquiera de los apartados 1 a 8, en donde la sensibilidad a la vacuna de WT1 se evalúa utilizando como indicador que la frecuencia de la existencia o la cantidad de células precursoras de CTL específicos de WT1 es 1,5 veces o mayor en comparación con la de un sujeto sano.
10. El método de selección de acuerdo con el apartado 1, en donde las células precursoras de CTL son células precursoras de CTL de tipo efector.
11. El método de selección de acuerdo con el apartado 10, que utiliza uno cualquiera del método del monómero de HLA, el método de dímero de HLA, el método del tetrámero de HLA, el método de pentámero de HLA, el método ELISPOT, la técnica de RT-PCR en tiempo real y el método de dilución limitante en la medición de la frecuencia de existencia o cantidad de células precursoras CTL específicos de WT1 de tipo efector.
12. El método de selección de acuerdo con el apartado 11, que utiliza el método del tetrámero de HLA.
13. El método de selección de acuerdo con el apartado 12, que comprende las siguientes etapas (a), (b), (c) y (d):
 - (a) aislar una muestra biológica que contiene las células precursoras de CTL de un sujeto de ensayo;
 - (b) poner en contacto un tetrámero de HLA que comprende un péptido antigénico tumoral derivado de WT1, un anticuerpo anti-CD8, un anticuerpo anti-CD45RA y un anticuerpo anti-CD27 con la muestra biológica de (a);
 - (c) medir la proporción de células precursoras de CTL positivas para CD45RA y negativas para CD27 de tipo efector entre las células precursoras de CTL que son positivas para CD8 o CD8/CD3 y positivos para la unión al tetrámero de HLA; y
 - (d) decidir si el resultado de (c) medido es o no elevado en comparación con el de un sujeto sano, y evaluar la sensibilidad a la vacuna de WT1.
14. El método de selección de acuerdo con el apartado 13, en donde el antígeno HLA como componente del tetrámero de HLA es un antígeno HLA-A24 o un antígeno HLA-A2.
15. El método de selección de acuerdo con el apartado 13 o 14, en donde el péptido antigénico tumoral derivado de WT1 se selecciona entre los siguientes péptidos:
 - Cys Met Thr Trp Asn Gln Met Asn Leu (SEQ ID NO: 2),
 - Cys Tyr Thr Trp Asn Gln Met Asn Leu (SEQ ID NO: 3),
 - Arg Met Phe Pro Asn Ala Pro Tyr Leu (SEQ ID NO: 4) y
 - Arg Tyr Pro Ser Cys Gln Lys Lys Phe (SEQ ID NO: 5).

16. El método de selección de acuerdo con uno cualquiera de los apartados 10 a 15, que se lleva a cabo utilizando citometría de flujo.
17. Un método de diagnóstico del cáncer, que comprende las siguientes etapas (a), (b) y (c):
- 5 (a) aislar una muestra biológica que contiene las células precursoras de CTL de un sujeto de ensayo;
 (b) medir la frecuencia de la existencia o la cantidad de células precursoras de CTL específicos de WT1 en la muestra biológica de (a); y
 (c) decidir si el resultado de (b) medido es o no elevado en comparación con el de un sujeto sano, y evaluar si el sujeto de ensayo tiene cáncer.
18. El método de diagnóstico de acuerdo con el apartado 17, en donde la medición de la frecuencia de la existencia o la cantidad de células precursoras de CTL específicos de WT1 se lleva a cabo por medio de uno cualquiera del método del monómero de HLA, el método del dímero de HLA, el método del tetrámero de HLA, el método del pentámero de HLA, el método ELISPOT, la técnica de RT-PCR en tiempo real y el método de dilución limitante.
19. El método de diagnóstico de acuerdo con el apartado 18, en donde la medición se lleva a cabo por medio del método del tetrámero de HLA.
20. El método de diagnóstico de acuerdo con el apartado 19, que comprende las siguientes etapas (a), (b), (c) y (d):
- 20 (a) aislar una muestra biológica que contiene las células precursoras de CTL de un sujeto de ensayo;
 (b) poner en contacto un tetrámero de HLA que comprende un péptido antigénico tumoral derivado de WT1 con la muestra biológica de (a);
 (c) medir la frecuencia de la existencia o la cantidad de células precursoras de CTL específicos de WT1 unidas al tetrámero de HLA; y
 (d) decidir si el resultado de (c) medido es o no elevado en comparación con el de un sujeto sano, y evaluar si el sujeto de ensayo tiene cáncer.
21. El método de diagnóstico de acuerdo con el apartado 20, en donde la etapa (c) de la reivindicación 20 se lleva a cabo midiendo la proporción de células unidas al tetrámero de HLA entre las células precursoras de CTL positivas para CD8 o positivas para CD8/CD3.
22. El método de diagnóstico de acuerdo con el apartado 20 o 21, en donde el antígeno HLA como un componente del tetrámero de HLA es un antígeno HLA-A24 o un antígeno HLA-A2.
- 30 23. El método de diagnóstico de acuerdo con uno cualquiera de los apartados 20 a 22, en donde el péptido antigénico tumoral derivado de WT1 se selecciona entre los siguientes péptidos:
 Cys Met Thr Trp Asn Gln Met Asn Leu (SEQ ID NO: 2),
 Cys Tyr Thr Trp Asn Gln Met Asn Leu (SEQ ID NO: 3),
 Arg Met Phe Pro Asn Ala Pro Tyr Leu (SEQ ID NO: 4) y
 Arg Tyr Pro Ser Cys Gln Lys Lys Phe (SEQ ID NO: 5).
24. El método de diagnóstico de acuerdo con uno cualquiera de los apartados 17 a 23, que se lleva a cabo utilizando citometría de flujo.
25. El método de diagnóstico de acuerdo con uno cualquiera de los apartados 17 a 24, en donde el cáncer se diagnostica utilizando como indicador que la frecuencia de la existencia o la cantidad de células precursoras de CTL específicos de WT1 es 1,5 veces o mayor en comparación con la de un sujeto sano.
26. El método de diagnóstico de acuerdo con el apartado 17, en donde las células precursoras de CTL son células precursoras de CTL de tipo efector.
27. El método de diagnóstico de acuerdo con el apartado 26, que utiliza uno cualquiera del método del monómero de HLA, el método de dímero de HLA, el método del tetrámero de HLA, el método de pentámero de HLA, el método ELISPOT, la técnica de RT-PCR en tiempo real y el método de dilución limitante en la medición de la frecuencia de existencia o cantidad de células precursoras CTL específicos de WT1 de tipo efector.
28. El método de diagnóstico de acuerdo con el apartado 27, que utiliza el método del tetrámero de HLA.
29. El método de diagnóstico de acuerdo con el apartado 28, que comprende las siguientes etapas (a), (b), (c) y (d):
- 50 (a) aislar una muestra biológica que contiene las células precursoras de CTL de un sujeto de ensayo;
 (b) poner en contacto un tetrámero de HLA que comprende un péptido antigénico tumoral derivado de WT1, un anticuerpo anti-CD8, un anticuerpo anti-CD45RA y un anticuerpo anti-CD27 con la muestra biológica de (a);
 (c) medir la proporción de células precursoras de CTL positivas para CD45RA y negativas para CD27 de tipo efector entre las células precursoras de CTL que son positivas para CD8 o CD8/CD3 y positivas para la unión al tetrámero de HLA; y
 (d) decidir si el valor de (c) medido es o no elevado en comparación con el de un sujeto sano, y evaluar si el sujeto tiene cáncer.
30. El método de diagnóstico de acuerdo con el apartado 29, en donde el antígeno HLA como un componente de tetrámero de HLA es un antígeno HLA-A24 o un antígeno HLA-A2.
31. El método de diagnóstico de acuerdo con el apartado 29 o 30, en donde el péptido antigénico tumoral derivado de WT1 se selecciona entre los siguientes péptidos:
 Cys Met Thr Trp Asn Gln Met Asn Leu (SEQ ID NO: 2),
 Cys Tyr Thr Trp Asn Gln Met Asn Leu (SEQ ID NO: 3),

Arg Met Phe Pro Asn Ala Pro Tyr Leu (SEQ ID NO: 4) y

Arg Tyr Pro Ser Cys Gln Lys Lys Phe (SEQ ID NO: 5).

32. El método de diagnóstico de acuerdo con uno cualquiera de los apartados 26 a 31, que se lleva a cabo utilizando citometría de flujo.

33. Un método de identificación de una molécula diana de la vacuna de WT1 siendo dicha molécula característica de un paciente, que comprende las siguientes etapas (a), (b), (c) y (d):

(a) aislar una muestra biológica que contiene las células precursoras de CTL de un paciente de ensayo;

(b) aplicar cada una de las moléculas diana plurales de la vacuna de WT1 a la muestra biológica de (a);

(c) medir la frecuencia de la existencia o la cantidad de células precursoras de CTL específicos de WT1 en las respectivas muestras biológicas de (b) y comparar los resultados entre sí; y

(d) identificar una molécula diana de la vacuna de WT1 eficaz para el paciente de ensayo sobre la base de los resultados obtenidos en (c).

34. El método de identificación de acuerdo con el apartado 33, en donde la medición de la frecuencia de la existencia o la cantidad de células precursoras de CTL específicos de WT1 se lleva a cabo por medio de uno cualquiera del método del monómero de HLA, el método del dímero de HLA, el método del tetrámero de HLA, el método del pentámero de HLA, el método ELISPOT, la técnica de RT-PCR en tiempo real y el método de dilución limitante.

35. El método de identificación de acuerdo con el apartado 34, en donde la medición se lleva a cabo por medio del método del tetrámero de HLA.

36. El método de identificación de acuerdo con el apartado 35, que comprende las siguientes etapas (a), (b), (c) y (d):

(a) aislar una muestra biológica que contiene las células precursoras de CTL de un paciente de ensayo;

(b) poner en contacto cada uno de los tetrámeros de HLA plurales que comprenden diferentes péptidos antigénicos tumorales derivados de WT1 con la muestra biológica de (a);

(c) medir la frecuencia de la existencia o la cantidad de células precursoras de CTL específicos de WT1 unidas a los respectivos tetrámeros de HLA, y comparar los resultados entre sí; y

(d) identificar un péptido antigénico tumoral derivado de WT1 eficaz para el paciente de ensayo sobre la base de los resultados obtenidos en (c).

37. El método de identificación de acuerdo con el apartado 36, en donde la etapa (c) del apartado 36 se lleva a cabo midiendo la proporción de células unidas al tetrámero de HLA entre las células precursoras de CTL positivas para CD8 o positivas para CD8/CD3.

38. El método de identificación de acuerdo con el apartado 36 o 37, en donde el antígeno HLA como un componente de tetrámero de HLA es un antígeno HLA-A24 o un antígeno HLA-A2.

39. El método de identificación de acuerdo con uno cualquiera de los apartados 36 a 38, en donde el péptido antigénico tumoral derivado de WT1 se selecciona entre los siguientes péptidos:

Cys Met Thr Trp Asn Gln Met Asn Leu (SEQ ID NO: 2),

Cys Tyr Thr Trp Asn Gln Met Asn Leu (SEQ ID NO: 3),

Arg Met Phe Pro Asn Ala Pro Tyr Leu (SEQ ID NO: 4) y

Arg Tyr Pro Ser Cys Gln Lys Lys Phe (SEQ ID NO: 5).

40. El método de identificación de acuerdo con uno cualquiera de los apartados 33 a 39, que se lleva a cabo utilizando citometría de flujo.

41. Un agente de diagnóstico clínico para la selección de un paciente altamente sensible a la vacuna de WT1, que comprende como ingrediente un monómero de HLA, un dímero de HLA, un tetrámero de HLA o un pentámero de HLA que contienen cada uno un péptido antigénico tumoral derivado de WT1.

42. El agente de diagnóstico clínico de acuerdo con el apartado 41, en donde el antígeno HLA como componente de un monómero de HLA, un dímero de HLA, un tetrámero de HLA o un pentámero de HLA es un antígeno HLA-A24 o un antígeno HLA-A2.

43. El agente de diagnóstico clínico de acuerdo con el apartado 41 o 42, en donde el péptido antigénico tumoral derivado de WT1 se selecciona entre los siguientes péptidos:

Cys Met Thr Trp Asn Gln Met Asn Leu (SEQ ID NO: 2),

Cys Tyr Thr Trp Asn Gln Met Asn Leu (SEQ ID NO: 3),

Arg Met Phe Pro Asn Ala Pro Tyr Leu (SEQ ID NO: 4) y

Arg Tyr Pro Ser Cys Gln Lys Lys Phe (SEQ ID NO: 5).

44. Un kit que comprende un agente de diagnóstico clínico de acuerdo con uno cualquiera de los apartados 41 a 43.

45. Una composición farmacéutica para tratar el cáncer en un paciente dado, que comprende una molécula diana identificada por medio del método de identificación de una molécula diana de la vacuna de WT1 siendo dicha molécula característica del paciente de acuerdo con uno cualquiera de los apartados 33 a 40.

46. Un agente de diagnóstico para el cáncer, que comprende como ingrediente un monómero de HLA, un dímero de HLA, un tetrámero de HLA o un pentámero de HLA que contienen cada uno un péptido antigénico tumoral derivado de WT1.

47. El agente de diagnóstico de acuerdo con el apartado 46, en donde el antígeno HLA como componente de un monómero de HLA, un dímero de HLA, un tetrámero de HLA o un pentámero de HLA es un antígeno HLA-A24 o un antígeno HLA-A2.

48. El agente de diagnóstico de acuerdo con el apartado 46 o 47, en donde el péptido antigénico tumoral derivado de WT1 se selecciona entre los siguientes péptidos:
 Cys Met Thr Trp Asn Gln Met Asn Leu (SEQ ID NO: 2),
 Cys Tyr Thr Trp Asn Gln Met Asn Leu (SEQ ID NO: 3),
 5 Arg Met Phe Pro Asn Ala Pro Tyr Leu (SEQ ID NO: 4) y
 Arg Tyr Pro Ser Cys Gln Lys Lys Phe (SEQ ID NO: 5).
49. Un kit que comprende un agente de diagnóstico de acuerdo con uno cualquiera de los apartados 46 a 48.
50. Un método de determinar la idoneidad de un paciente para la vacuna de WT1, que comprende las siguientes etapas (a), (b) y (c):
 10 (a) aislar una muestra biológica que contiene los CTL de un paciente después de la administración de la vacuna de WT1;
 (b) medir la frecuencia de la existencia o la cantidad de CTL específicos de WT1 en la muestra biológica de (a);
 (c) decidir si el valor de (b) medido es o no elevado en comparación con el de la muestra biológica obtenida antes de la administración de la vacuna de WT1, y evaluar si el paciente es adecuado para la terapia con la vacuna de WT1.
51. El método de determinación de acuerdo con el apartado 50, en donde la medición de la frecuencia de la existencia o la cantidad de CTL específicos de WT1 se lleva a cabo por medio de uno cualquiera del método del monómero de HLA, el método del dímero de HLA, el método del tetrámero de HLA, el método del pentámero de HLA, el método ELISPOT, la técnica de RT-PCR en tiempo real y el método de dilución limitante.
52. El método de determinación de acuerdo con el apartado 51, en donde la medición se lleva a cabo por medio del método del tetrámero de HLA.
53. El método de determinación de acuerdo con el apartado 52, que comprende las siguientes etapas (a), (b), (c) y (d):
 25 (a) aislar una muestra biológica que contiene los CTL de un paciente después de la administración de la vacuna de WT1;
 (b) poner en contacto un tetrámero de HLA que comprende un péptido antigénico tumoral derivado de WT1 con la muestra biológica de (a);
 (c) medir la frecuencia de la existencia o la cantidad de CTL específicos de WT1 unidos al tetrámero de HLA; y
 30 (d) decidir si el valor de (c) medido es o no elevado en comparación con el de la muestra biológica obtenida antes de la administración de la vacuna de WT1, y evaluar si el paciente es adecuado para la terapia con la vacuna de WT1.
54. El método de determinación de acuerdo con el apartado 53, en donde la etapa (c) del apartado 53 se lleva a cabo midiendo la proporción de células unidas al tetrámero de HLA entre los CTL positivos para CD8 o positivos para CD8/CD3.
55. El método de determinación de acuerdo con el apartado 53 o 54, en donde el antígeno HLA como componente de tetrámero de HLA es un antígeno HLA-A24 o un antígeno HLA-A2.
56. El método de determinación de acuerdo con uno cualquiera de los apartados 53 a 55, en donde el péptido antigénico tumoral derivado de WT1 se selecciona entre los siguientes péptidos:
 Cys Met Thr Trp Asn Gln Met Asn Leu (SEQ ID NO: 2),
 Cys Tyr Thr Trp Asn Gln Met Asn Leu (SEQ ID NO: 3),
 Arg Met Phe Pro Asn Ala Pro Tyr Leu (SEQ ID NO: 4) y
 Arg Tyr Pro Ser Cys Gln Lys Lys Phe (SEQ ID NO: 5).
57. El método de determinación de acuerdo con uno cualquiera de los apartados 50 a 56, que se lleva a cabo utilizando citometría de flujo.
58. El método de determinación de acuerdo con uno cualquiera de los apartados 50 a 57, en donde la idoneidad para la terapia de vacuna de WT1 se evaluó utilizando como indicador que la frecuencia de la existencia o la cantidad de CTL específicos de WT1 es 1,5 veces o mayor en comparación a la de la muestra obtenida antes de la administración.
59. Un agente de diagnóstico clínico para determinar la idoneidad para la vacuna de WT1 que comprende como ingrediente un monómero de HLA, un dímero de HLA, un tetrámero de HLA o un pentámero de HLA que contienen cada uno un péptido antigénico tumoral derivado de WT1.
60. El agente de diagnóstico clínico de acuerdo con el apartado 59, en donde el antígeno HLA como componente de un monómero de HLA, un dímero de HLA, un tetrámero de HLA o un pentámero de HLA es un antígeno HLA-A24 o un antígeno HLA-A2.
61. El agente de diagnóstico clínico de acuerdo con el apartado 59 o 60, en donde el péptido antigénico tumoral derivado de WT1 se selecciona entre los siguientes péptidos:
 Cys Met Thr Trp Asn Gln Met Asn Leu (SEQ ID NO: 2),
 Cys Tyr Thr Trp Asn Gln Met Asn Leu (SEQ ID NO: 3),
 Arg Met Phe Pro Asn Ala Pro Tyr Leu (SEQ ID NO: 4) y
 Arg Tyr Pro Ser Cys Gln Lys Lys Phe (SEQ ID NO: 5).
62. Un kit que comprende un agente de diagnóstico clínico de acuerdo con uno cualquiera de los apartados 59 a 61. \$\$\$

ES 2 443 582 T3

Gly Ser Leu Gly Gly Pro Ala Pro Pro Pro Ala Pro Pro Pro Pro Pro
 50 55 60

Pro Pro Pro Pro His Ser Phe Ile Lys Gln Glu Pro Ser Trp Gly Gly
 65 70 75 80

Ala Glu Pro His Glu Glu Gln Cys Leu Ser Ala Phe Thr Val His Phe
 85 90 95

Ser Gly Gln Phe Thr Gly Thr Ala Gly Ala Cys Arg Tyr Gly Pro Phe
 100 105 110

Gly Pro Pro Pro Pro Ser Gln Ala Ser Ser Gly Gln Ala Arg Met Phe
 115 120 125

Pro Asn Ala Pro Tyr Leu Pro Ser Cys Leu Glu Ser Gln Pro Ala Ile
 130 135 140

Arg Asn Gln Gly Tyr Ser Thr Val Thr Phe Asp Gly Thr Pro Ser Tyr
 145 150 155 160

Gly His Thr Pro Ser His His Ala Ala Gln Phe Pro Asn His Ser Phe
 165 170 175

Lys His Glu Asp Pro Met Gly Gln Gln Gly Ser Leu Gly Glu Gln Gln
 180 185 190

Tyr Ser Val Pro Pro Pro Val Tyr Gly Cys His Thr Pro Thr Asp Ser
 195 200 205

Cys Thr Gly Ser Gln Ala Leu Leu Leu Arg Thr Pro Tyr Ser Ser Asp
 210 215 220

Asn Leu Tyr Gln Met Thr Ser Gln Leu Glu Cys Met Thr Trp Asn Gln
 225 230 235 240

ES 2 443 582 T3

Met Asn Leu Gly Ala Thr Leu Lys Gly Val Ala Ala Gly Ser Ser Ser
245 250 255

Ser Val Lys Trp Thr Glu Gly Gln Ser Asn His Ser Thr Gly Tyr Glu
260 265 270

Ser Asp Asn His Thr Thr Pro Ile Leu Cys Gly Ala Gln Tyr Arg Ile
275 280 285

His Thr His Gly Val Phe Arg Gly Ile Gln Asp Val Arg Arg Val Pro
290 295 300

Gly Val Ala Pro Thr Leu Val Arg Ser Ala Ser Glu Thr Ser Glu Lys
305 310 315 320

Arg Pro Phe Met Cys Ala Tyr Pro Gly Cys Asn Lys Arg Tyr Phe Lys
325 330 335

Leu Ser His Leu Gln Met His Ser Arg Lys His Thr Gly Glu Lys Pro
340 345 350

Tyr Gln Cys Asp Phe Lys Asp Cys Glu Arg Arg Phe Ser Arg Ser Asp
355 360 365

Gln Leu Lys Arg His Gln Arg Arg His Thr Gly Val Lys Pro Phe Gln
370 375 380

Cys Lys Thr Cys Gln Arg Lys Phe Ser Arg Ser Asp His Leu Lys Thr
385 390 395 400

His Thr Arg Thr His Thr Gly Lys Thr Ser Glu Lys Pro Phe Ser Cys
405 410 415

Arg Trp Pro Ser Cys Gln Lys Lys Phe Ala Arg Ser Asp Glu Leu Val
420 425 430

Arg His His Asn Met His Gln Arg Asn Met Thr Lys Leu Gln Leu Ala
435 440 445

Leu

5

<210> 2
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido Sintético
 <400> 2

Cys Met Thr Trp Asn Gln Met Asn Leu

5 1 5

<210> 3
 <211> 9
 <212> PRT
 10 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido Sintético
 <400> 3

Cys Tyr Thr Trp Asn Gln Met Asn Leu

15 1 5

<210> 4
 <211> 9
 <212> PRT
 20 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido Sintético
 <400> 4

Arg Met Phe Pro Asn Ala Pro Tyr Leu

25 1 5

<210> 5
 <211> 9
 <212> PRT
 30 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido Sintético
 <400> 5

Arg Tyr Pro Ser Cys Gln Lys Lys Phe

35 1 5

<210> 6
 <211> 9
 <212> PRT
 40 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido Sintético
 <400> 6

Ser Tyr Thr Trp Asn Gln Met Asn Leu

45 1 5

<210> 7
 <211> 9
 <212> PRT
 50 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido Sintético
 <400> 7

Ala Tyr Thr Trp Asn Gln Met Asn Leu

1 5

5 <210> 8
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido Sintético
 10 <223> Xaa en la posición 1 representa Abu.
 <400> 8

Xaa Tyr Thr Trp Asn Gln Met Asn Leu

1 5

15 <210> 9
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 20 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido Sintético
 <400> 9

Arg Tyr Thr Trp Asn Gln Met Asn Leu

1 5

25 <210> 10
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 30 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido Sintético
 <400> 10

Lys Tyr Thr Trp Asn Gln Met Asn Leu

1 5

35 <210> 11
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 40 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido Sintético
 <400>11

Arg Tyr Phe Pro Asn Ala Pro Tyr Leu

1 5

45 <210> 12
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 50 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido Sintético
 <400> 12

Arg Tyr Pro Gly Val Ala Pro Thr Leu

1 5

5
 <210> 13
 <211>9
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido Sintético
 <400> 13

Ala Tyr Leu Pro Ala Val Pro Ser Leu

10
 1 5
 <210> 14
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 15
 <220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido Sintético
 <400> 14

Asn Tyr Met Asn Leu Gly Ala Thr Leu

20
 1 5
 <210> 15
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 25
 <220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido Sintético
 <400> 15

Arg Val Pro Gly Val Ala Pro Thr Leu

30
 1 5
 <210> 16
 <211>9
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 35
 <220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido Sintético
 <400> 16

Arg Tyr Pro Ser Ser Gln Lys Lys Phe

40
 1 5
 <210> 17
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 45
 <220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido Sintético
 <400> 17

Arg Tyr Pro Ser Ala Gln Lys Lys Phe

50
 1 5
 <210> 18
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido Sintético
 <223> Xaa en la posición 5 representa Abu.
 <400> 18
 5
 Arg Tyr Pro Ser Xaa Gln Lys Lys Phe
 1 5
 <210> 19
 <211> 40
 10 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Cebador de PCR
 <400> 19
 15 ccatgggcag ccattctatg cgctatTTTT ctacctcgt 40
 <210> 20
 <211> 45
 20 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Cebador de PCR
 <400> 20
 25 ggatcctggc tccatctca gggtagggg cttgggcaga ccctc 45
 <210> 21
 <211> 30
 30 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Cebador de PCR
 <400> 21
 35 catatgatcc agcgtacccc gaaaattcag 30
 <210> 22
 <211> 30
 40 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Cebador de PCR
 <400> 22
 45 ggatccttac atgtctcgat cccactaac 30

REIVINDICACIONES

1. Un método in vitro para diagnosticar el cáncer, que comprende las siguientes etapas (a) y (b):
5 (a) medir la frecuencia de la existencia o la cantidad de células precursoras de CTL específicos de WT1 en una muestra biológica que contiene células precursoras de CTL de un sujeto de ensayo; y
(b) decidir el valor de (a) medido es o no elevado en comparación con el de un sujeto sano, y evaluar el sujeto de ensayo como un paciente que tiene cáncer cuando el valor medido de (a) es 1,5 veces o mayor que el de un sujeto sano,
10 en donde la medición de la frecuencia de la existencia o la cantidad de células precursoras de CTL específico de WT1 específico se lleva a cabo por medio de uno cualquiera del método del monómero HLA, el método del dímero de HLA, el método del tetrámero de HLA y el método del pentámero HLA.
2. El método de diagnóstico de cáncer de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la medición se lleva a cabo por medio del método de tetrámero de HLA.
15
3. El método de diagnóstico del cáncer de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la etapa (b) de la reivindicación 1 se lleva a cabo mediante la medición de la proporción de células unidas al tetrámero de HLA entre los CTL positivos para CD8 o positivos para CD8/CD3.
- 20 4. El método de diagnóstico del cáncer de acuerdo con la reivindicación 3, en donde el antígeno HLA como componente del tetrámero de HLA es un antígeno HLA-A24 o un antígeno HLA-A2.
5. El método de diagnóstico de cáncer de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, que se lleva a cabo utilizando la citometría de flujo.
25
6. El método de diagnóstico de cáncer de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el antígeno HLA como componente de un monómero de HLA, un dímero de HLA, un tetrámero de HLA o un pentámero de HLA es un antígeno HLA-A24.
30

